



OPTIMIZAÇÃO DOS TESTES DE GERMINAÇÃO PARA MONITORIZAÇÃO DAS COLECÇÕES DE PLANTAS AUTÓCTONES CONSERVADAS EM BANCOS DE SEMENTES

Carla Antónia Mendes da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadora: Doutora Maria Dalila Paula Silva Lourenço do Espírito Santo
Co-orientadora: Doutora Maria Adelaide dos Santos Clemente

Júri:

Presidente - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Técnica de Lisboa

Vogais - Doutora Maria Dalila Paula Silva Lourenço do Espírito Santo, Investigadora
Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Técnica de
Lisboa

Doutora Maria Manuela de Faria Veloso, Investigadora Auxiliar do Instituto
Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Doutora Ana Cristina Delaunay Caperta, Investigadora Auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Técnica de Lisboa

Doutora Maria Adelaide dos Santos Clemente

Lisboa, 2012

**“You must be the change you
want to see in the world”**

(Mahatma Ghandi).

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho foi possível graças ao empenho e dedicação, que algumas pessoas dispensaram, assumindo especial importância na sua orientação e supervisão.

Assim, desejo expressar os meus agradecimentos à minha co-orientadora Professora Doutora Maria Adelaide Clemente, cuja disponibilidade e ensinamentos metodológicos transmitidos muito contribuíram para que este trabalho pudesse acontecer, mas também o seu incentivo e a palavra de conforto nos momentos menos fáceis.

Gostaria de endereçar os meus agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Dalila Espírito Santo, pelo interesse e apoio.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho. E muito especialmente...

À minha família, por todo o apoio e carinho durante estes últimos meses.

Ao Rui, que em todos os momentos foi o companheiro que alguém poderia desejar, pelo seu estar a meu lado, pela sua força, paciência e amor...

Obrigado.

RESUMO

OPTIMIZAÇÃO DOS TESTES DE GERMINAÇÃO PARA MONITORIZAÇÃO DAS COLECÇÕES DE PLANTAS AUTÓCTONES CONSERVADAS EM BANCOS DE SEMENTES

Com o objectivo de contribuir para otimizar testes de germinação para monitorização das colecções de plantas autóctones conservadas em bancos de sementes, foram testados os efeitos de pré-tratamentos e da temperatura na germinação máxima, na velocidade de germinação (T50) e duração do período de germinação (T10-90) de 16 espécies de plantas autóctones.

As espécies foram sujeitas a pré-tratamentos de germinação para quebrar a dormência. As famílias Scrophulariaceae e Umbelliferae sofreram estratificação fria (30 dias) a 4°C; as Fabaceae e Malvaceae escarificação mecânica e a Cistaceae escarificação térmica a 115°C (10 min.). As sementes foram incubadas em quatro regimes de temperatura 15°C, 20°C, 25°C e 15°/25°C, com o fotoperíodo de 8 horas de luz/16 horas de escuro.

As espécies germinaram melhor quando sujeitas aos seguintes pré-tratamentos e temperaturas: na Cistaceae (escarificação térmica): *Tuberaria lignosa* a 20°C e *Halimium lasianthum* a 15°/25°C; na Fabaceae (escarificação mecânica): o *Adenocarpus complicatus* a 15°C e 20°C, o *Cytisus villosus* 15°C e a *Vicia sativa* subsp. *nigra* a 20°C; na Malvaceae (escarificação mecânica): *Alcea rosea* a 20°C, as *Lavatera arborea* e *Lavatera cretica* a 15°C. Os pré-tratamentos aplicados não promoveram a germinação das espécies das famílias de Scrophulariaceae e Umbelliferae.

PALAVRAS-CHAVE: banco de sementes, germinação, semente, conservação *ex situ*, temperatura.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF GERMINATION TESTS FOR MONITORING OF NATIVE PLANTS PRESERVED COLLECTIONS IN SEED BANKS

With the aim to contribute to the optimization of germination tests to monitor the seed collections of native plants conserved in seed banks, germination percentage, germination rate (T50) and length of the germination period (T10-90) were evaluated in 16 species studied on four temperatures 15°C, 20°C, 25°C and 15°/25 °C.

The species were subject to pre-germination treatments to break dormancy: cold stratification (30 days) at 4°C in Scrophulariaceae and Umbelliferae, mechanical scarification in Malvaceae, and Fabaceae, and thermal scarification (115°C, 10 min.) in Cistaceae. Seeds were incubated in a photoperiod of 8 hours light/16 hours dark.

According to results, the species germinated better for the following pretreatments and temperatures: in Cistaceae (thermal scarification): *Tuberaria lignosa* at 20°C and *Halimium lasianthum* to 15°/25°C; in the Fabaceae (mechanical scarification): *Adenocarpus complicatus* at 15°C and 20°C, *Cytisus villosus* at 15°C and *Vicia sativa* subsp.nigra at 20°C; in Malvaceae (mechanical scarification): *Alcea rosea* at 20°C, *Lavatera arborea* and *Lavatera cretica* at 15°C. Pretreatments did not promote the germination of species of the families Scrophulariaceae and Umbelliferae.

Key words: seed bank, germination, seed, *ex situ* conservation, temperature.

EXTENDED ABSTRACT

OPTIMIZATION OF GERMINATION TESTS FOR MONITORING OF NATIVE PLANTS PRESERVED COLLECTIONS IN SEED BANKS

With increasing human pressure held on natural areas, reflected in a continuous increase of use and occupation, through agriculture, construction, urbanization, forest destruction, pollution, among others, there has been a sharp deterioration environment (Hens & Boon, 2003; Pinho *et al.*, 2003; Polasky *et al.*, 2005), resulting in the loss of plant species (IUCN, 2012; Pimm & Raven, 2000; Walter & Gillett, 1998).

The botanical gardens were considered as the first entities involved in ex-situ conservation of genetic resources, notably through the implementation of plant collections and establishment of seed banks (Draper *et al.*, 2004).

The role of seed banks have intensified over the years, offering major advantages as ease of storage, space savings and ability to keep large quantities of samples at a cost that is economically viable (BGCI, 2000).

For the conservation of seeds several steps are recommended (Hong & Ellis, 1996; Smith *et al.*, 2003; ENSCONET, 2009a), namely:

- Cleaning and identification of damaged seeds, which is essential to the determination of viable seeds through cut test, X-ray analysis or tetrazolium tests;
- Drying and determination of seed water content. A germination test should be performed before and after drying, to identify the effects of drying on seed germination;
- Packaging - placing the seed in suitable containers ensuring the maintenance of low seed moisture content and their subsequent longevity;
- Storage, having regard to the recommended temperatures for preservation. A germination test must be carried out one month after this step.
- germination tests performed, in order to ensure the viability of the register.
- Regeneration / multiplication of collections (when necessary).

For germination tests, seeds may be subjected to pretreatments with the aim of breaking seed dormancy, since the seeds do not germinate although afforded optimum germination conditions and are viable.

In species belonging to Cistaceae, Malvaceae Fabaceae, there is a physical dormancy. Scarification, which may be mechanical, thermal or chemical, should be applied with the aim of breaking the impermeable seed coats (ENSCONET, 2009a).

In species belonging to Scrophulariaceae and Umbelliferae physiological or morphophysiological dormency may occur (Baskin & Baskin, 2001), for which one can apply various pretreatments, such as stratification or gibberellic acid (Baccheta, *et al.*, 2008).

16 species, from 5 families, were selected with the aim to contribute to the optimization of germination tests to monitor the collections of native plants conserved in seed banks: *Adenocarpus complicatus*; *Alcea rosea*; *Angelica pachycarpa*; *Cytisus villosus*; *Elaeoselium foetidum*; *Halimium lasianthum*; *Lavatera arborea*; *Lavatera cretica*; *Margotia gummifera*; *Scrophularia auriculata*; *Scrophularia scorodonia*; *Smyrniololus olusatrum*; *Vicia sativa* subsp. *nigra*; *Tuberaria lignosa*; *Verbascum litigiosum* e *Verbascum virgatum*.

Species were selected among the accessions of native species in the A.L. Belo Correia Seed Bank awaiting for germination test prior to storage at -18°C. Seeds were dried at 15°C and 15% relative humidity and maintained in test tubes until use in germination tests.

The effects of pretreatment and temperature on final germination percentage, germination rate (T50) and length of the germination period (T10-90) of the selected species were tested in a factorial experiment using standard germination tests. The pretreatments were applied in two levels (control and one pretreatment which varied among plant families: cold stratification (4°C) during 30 days for Scrophulariaceae and Umbelliferae, mechanical scarification (abrasion with sandpaper) for Malvaceae and Fabaceae, and thermal scarification to 115°C (during 15 minutes) for Cistaceae and temperature in four levels (15°C; 20°C; 25°C e 25°/15°C). Four replicates of 25 seeds were used, placed in a 9 cm diameter *Petri* dish on a filter paper moistened with distilled water up to saturation.

The *Petri* dishes were placed in germination incubators (Fitoclima Aralab, S600 PLH) a photoperiod of 8/16 hours (light/ darkness).

Seed germination was defined as the emergence of the radicle (Villamil & Laborde, 2001). All tests lasted 30 days, the seeds germinated were counted every 2-3 days. At the end of the incubation period, a cut test was used to check seed viability.

The effects of pretreatments and temperature on germination percentage, T50 and T10-90 were analysed with two way ANOVA using the Statistica 10.0 package (StatSoft Inc.). Data were transformed whenever assumptions of homogeneity of variance and normality were not met.

According to results, the species germinated better for the following pre-treatments and temperatures: in Cistaceae (thermal scarification): *Tuberaria lignosa* at 20°C and *Halimium lasianthum* to 15°/25°C; in the Fabaceae (mechanical scarification): *Adenocarpus complicatus* at 15°C and 20°C, *Cytisus villosus* at 15°C and *Vicia sativa* subsp. *nigra* at 20°C; in Malvaceae (mechanical scarification): *Alcea rosea* at 20°C, *Lavatera arborea* and *Lavatera cretica* at 15°C. Pre-treatments did not promote the germination of species of the families Scrophulariaceae and Umbelliferae.

Key words: germination, germination tests, seed, seed bank, temperature.

ÍNDICE

1. Introdução	15
2. Enquadramento teórico	19
2.1. Conservação da biodiversidade	19
2.2. Estratégias para a conservação da biodiversidade	21
2.3. Conservação <i>ex situ</i>	23
2.4. Processos de conservação de um banco de sementes	26
2.4.1. Colheita e limpeza das sementes	27
2.4.2. Secagem das sementes	31
2.4.3. Estimativa da quantidade de sementes	33
2.4.4. Acondicionamento das sementes	33
2.4.5. Armazenamento das sementes	34
2.4.6. Testes de viabilidade	35
2.4.7. Testes de germinação	36
2.5. A semente	37
2.5.1. Germinação	39
2.5.2. Condições favoráveis à germinação das sementes	40
2.5.3. Impedimentos à germinação: dormência	41
2.5.4. Quebra da dormência	43
2.6. Objectivos do estudo	44
3. Materiais e métodos	45
3.1. Material utilizado	45
3.2. Caracterização taxonómica e nomenclatural	45
3.3. Ecologia habitat e distribuição	48
3.4. Local de colheita e condições de armazenamento	50
3.5. Preparação das sementes	51
3.6. Desenho experimental	53
3.7. Pré-tratamentos	54
3.8. Expressão dos resultados	56
4. Resultados	58
5. Discussão	74
6. Considerações finais	88
7. Referências bibliográficas	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios biológicos, ecológicos para priorizar as espécies com fins de conservação <i>ex situ</i> e recuperação ecológica (Gold <i>et al.</i> , 2004).	21
Quadro 2	Vantagens e desvantagens da reprodução sexuada (Adaptado de Boutherin & Bron, 2000).	26
Quadro 3	Elementos principais nos processos de conservação de um banco de sementes (Adaptado de Smith <i>et al.</i> , 2003).	27
Quadro 4	Quantidade de sementes viáveis, por amostra requeridos para determinados fins.	30
Quadro 5	Protocolo para determinar o comportamento de conservação das sementes.	32
Quadro 6	Espécies estudadas, família, respectivo nome vulgar e tipo fisionómico, ciclo de vida, época de floração e dispersão da semente, tipo de fruto e dormência (Castroviejo <i>et al.</i> , 1993; Franco, 1971; González <i>et al.</i> , 2009; Nieto <i>et al.</i> , 2003; Rocha, 1996; Talavera <i>et al.</i> , 1999).	46
Quadro 7	Habitats das espécies em estudo (Castroviejo <i>et al.</i> , 1993; González <i>et al.</i> , 2009; Nieto <i>et al.</i> , 2003; Talavera <i>et al.</i> , 1999).	48
Quadro 8	Espécies seleccionadas, local e data de colheita dos diásporos, com respectivo número de registo no BS A. L. Belo Correia.	50
Quadro 9	N.º de sementes estimado por lote de sementes.	52
Quadro 10	N.º de sementes por amostra total.	53
Quadro 11	Síntese do pré-tratamento utilizado, temperaturas de germinação, número de réplicas e quantidade de sementes por réplica para as espécies estudadas.	53
Quadro 12	Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação térmica e controlo) e temperatura (20°C e 15/25°C) na percentagem de germinação máxima de <i>H. lasianthum</i> e <i>T. lignosa</i> , incubadas 30 dias em condições controladas.	58
Quadro 13	Resultados do teste t para os efeitos da temperatura no T50 e T10-90 de sementes escarificadas de <i>H. lasianthum</i> e <i>T. lignosa</i> incubadas 30 dias em condições controladas em duas temperaturas.	59
Quadro 14	Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura na percentagem de germinação máxima de <i>A. complicatus</i> (15°C, 20°C e 15/25°C), <i>C. villosus</i> (15°C e 20°C) e <i>V. sativa subsp. nigra</i> (15°C, 20°C, 25°C, e 15/25°C), incubadas 30 dias em condições controladas.	62

Quadro 15	Resultados do teste t os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) na percentagem de germinação máxima de sementes de <i>C. villosus</i> incubadas 30 dias em condições controladas em duas temperaturas (15°C e 20°C).	64
Quadro 16	Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura na velocidade de germinação (T50) e duração do período de germinação (T10-90) de <i>A. complicatus</i> , <i>C. villosus</i> e <i>V. sativa subsp. nigra</i> , incubadas 30 dias em condições controladas.	64
Quadro 17	Resultados do teste t para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) na duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>Vicia sativa subsp. nigra</i> incubadas 30 dias em condições controladas em quatro temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C).	67
Quadro 18	Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C, e 15/25°C, para todas as espécies excepto para a <i>A. rosea</i> 15°C, 20°C e 15/25°C) na percentagem de germinação máxima de <i>A. rosea</i> , <i>L. arborea</i> e <i>L. cretica</i> , incubadas 30 dias em condições controladas.	69
Quadro 19	Resultados do teste t para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) na percentagem de germinação máxima de sementes de <i>L. arborea</i> e <i>L. cretica</i> , incubadas 30 dias em condições controladas em quatro temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C).	71
Quadro 20	Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C) na velocidade de germinação (T50) e na duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>L. arborea</i> incubadas 30 dias em condições controladas.	73
Quadro 21	Resultados do teste t para os efeitos da temperatura no T50 e T10-90 de sementes escarificadas de <i>L. cretica</i> , incubadas 30 dias em condições controladas a 15°C e 20°C.	74
Quadro 22	Resultados da germinação de sementes de <i>S. auriculata</i> , <i>S. scorodonia</i> , <i>V. litigiosum</i> , <i>V. virgatum</i> , <i>A. pachycarpa</i> , <i>E. foetidum</i> , <i>M. gummifera</i> e <i>S. olusatrum</i> , sujeitas a tratamento (estratificação a frio e controlo) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C), incubadas 30 dias em condições controladas.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo proposto por Maxted <i>et al.</i> , (1997), para a conservação genética.	23
Figura 2	Diagrama dos principais processos e instalações de um banco de sementes (ENSCONET, 2009b).	28
Figura 3	Esquema da semente monocotilédnea (DESAI <i>et al.</i> , 1997).	38
Figura 4	Esquema da semente dicotilédnea (DESAI <i>et al.</i> , 1997).	38
Figura 5	Processo fisiológico da germinação (DESAI <i>et al.</i> , 1997).	39
Figura 6	Sementário.	51
Figura 7	Fotografias das sementes das plantas autóctones.	52
Figura 8	Câmara de germinação com as placas de <i>Petri</i> , durante o ensaio e pormenores das mesmas.	55
Figura 9	Curvas de germinação de sementes de <i>T. lignosa</i> , sujeitas a escarificação térmica e controlo em (a) regime de temperatura constante 20°C e em (b) regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	58
Figura 10	Curvas de germinação de sementes de <i>H. lasianthum</i> , sujeitas a escarificação térmica e controlo em (a) regime de temperatura constante 20°C e em (b) regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	59
Figura 11	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>T. lignosa</i> , sujeitas a escarificação térmica, em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	60
Figura 12	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>H. lasianthum</i> , sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	60
Figura 13	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>T. lignosa</i> , sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	61

Figura 14	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>H. lasianthum</i> , sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	61
Figura 15	Curvas de germinação de sementes de <i>A. complicatus</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C, em (b) regime de temperatura constante 20°C e em (c) regime de alternância 15/25°C, com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	62
Figura 16	Curvas de germinação de sementes de <i>C. villosus</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C e em (b) regime de temperatura constante 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	63
Figura 17	Curvas de germinação de sementes de <i>V. sativa</i> subsp. <i>nigra</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	63
Figura 18	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>C. villosus</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	65
Figura 19	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>V. sativa</i> L. subsp. <i>nigra</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	65
Figura 20	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>A. complicatus</i> , sujeitas a escarificação mecânica em diferentes regimes de temperatura, com fotoperíodo de 8 h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	66
Figura 21	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>C. villosus</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	66
Figura 22	Velocidade de germinação (T10-90) de sementes de <i>V. sativa</i> subsp. <i>nigra</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	67

Figura 23	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>A. complicatus</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C e regime de alternância 15/25°C, com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.	68
Figura 24	Curvas de germinação de sementes de <i>A. rosea</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C e em (c) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	70
Figura 25	Curvas de germinação de sementes de <i>L. arborea</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	71
Figura 26	Curvas de germinação de sementes de <i>L. cretica</i> , sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	72
Figura 27	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>L. arborea</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regime de temperatura constante de 15°C; 20°C; 25°C e regime de alternância de 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	73
Figura 28	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>L. arborea</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regime de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância de 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	73
Figura 29	Velocidade de germinação (T50) de sementes de <i>L. cretica</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	74
Figura 30	Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de <i>L. cretica</i> , sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. complicatus</i>	<i>Adenocarpus complicatus</i> (L.) Gay
<i>A. rosea</i>	<i>Alcea rosea</i> L
<i>A. pachycarpa</i>	<i>Angelica pachycarpa</i> Lange
BGCI	Botanic Gardens Conservation International
BS	Bancos de Sementes
BS AL Belo Correia	Bancos de Semente António Luís Belo Correia
<i>C. villosus</i>	<i>Cytisus villosus</i> Pourr
<i>E. foetidum</i>	<i>Elaeoselinum foetidum</i> (L.) Boiss
<i>H. lasianthum</i>	<i>Halimium lasianthum</i> (Lam.) Spach
ICNB	Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade
INRB	Instituto Nacional de Recursos Biológicos
IUCN	International Union for Conservation of Nature
ISTA	International Seed Testing Association
KEW	Royal Botanic Gardens
<i>L. arborea</i>	<i>Lavatera arborea</i> L.
<i>L. cretica</i>	<i>Lavatera cretica</i> L.
MAOT	Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território
<i>M. gummifera</i>	<i>Margotia gummifera</i> (Desf.) Lange
<i>S. auriculata</i>	<i>Scrophularia auriculata</i> Loefl. ex. L
<i>S. scorodonia</i>	<i>Scrophularia scorodonia</i> L.
<i>S. olusatrum</i>	<i>Smyrniolum olusatrum</i> L.
<i>T. lignosa</i>	<i>Tuberaria lignosa</i> (Sweet) Samp.
<i>V. sativa</i> L. subsp. <i>nigra</i>	<i>Vicia sativa</i> L. subsp. <i>nigra</i> (L.) Ehrh
<i>V. litigiosum</i>	<i>Verbascum litigiosum</i> Samp.
<i>V. virgatum</i>	<i>Verbascum virgatum</i> Vill.

1.INTRODUÇÃO

As plantas representam para a vida no nosso planeta, um papel primordial, pois de forma directa ou indirecta contribuem para a existência de outros seres vivos, servindo-lhes de alimento, abrigo e fonte de matérias-primas (Prance, 1997), não esquecendo a grande importância que têm na regulação do clima, formação do solo, protecção contra a erosão, reciclagem de nutrientes e produção/manutenção de uma atmosfera rica em oxigénio (Henriques, 2002).

Apesar de se conhecer a importância das plantas, a verdade é que a diversidade biológica, ou seja a biodiversidade genética, taxonómica e dos ecossistemas está a ser devastada a um ritmo muito superior ao do conhecimento de quais as espécies existentes e qual o papel que desempenham na manutenção dos ecossistemas (Pité & Avelar, 1996; Rosa, 2002).

Em 1992, Mantas define o ecossistema, de forma simplificada, como sendo o conjunto de interacções que ocorrem no interior duma comunidade integrada no seu ambiente. E é na verdade, nas interacções internas modificadas principalmente pela acção do Homem, que residem as perdas da biodiversidade.

De acordo com Pinho *et. al.* (2003), a conservação da nossa flora, dos seus habitats e em consequência da biodiversidade vegetal, é um dos importantes apelos dos nossos tempos, uma vez que estes seres desempenham um papel fundamental no equilíbrio do nosso ecossistema.

Para que possamos pensar em conservar a diversidade biológica, temos que começar por conhecer a flora de um dado território, pois é um elemento essencial para a sua caracterização, em virtude das comunidades vegetais serem fixas. A flora é utilizada como indicador privilegiado do estado de conservação de determinado local.

Com a crescente pressão humana exercida sobre as zonas naturais, traduzida num contínuo aumento da sua utilização e ocupação, através da agricultura, construção de barragens, da urbanização, da destruição de florestas, da poluição, entre outros, assiste-se a uma acentuada degradação ambiental (Hens & Boon, 2003; Pinho *et. al.*, 2003; Polasky *et. al.*, 2005), originando a perda muitas vezes, quase irremediável, de espécies vegetais (IUCN, 2012; Pimm & Raven, 2000; Walter & Gillett, 1998).

Como afirma Carapeto (1998), o desaparecimento ou empobrecimento de ecossistemas acarreta a extinção de outras espécies que deles dependem, originando um ciclo de destruição.

Portugal encontra-se entre os países europeus com maior diversidade biológica (Azedo, 2003), o que não é garantia de futuro, dado que os investigadores calculam que o ritmo actual de extinções oscile entre 50 e os 70% dos territórios (Soulé & Sanjayan, 1998).

Importa igualmente realçar que a biodiversidade concorre também para mitigar a fome e a pobreza e promove a saúde humana (Waylen, 2006).

Assim sendo, torna-se prioritário criar e desenvolver medidas que permitam uma gestão eficaz e racional dos ecossistemas, que se alicercem em conhecimentos profundos sobre os seres vivos presentes e as suas relações entre si e o meio físico.

Face à destruição crescente dos recursos naturais por parte do Homem, pretende-se salvaguardar e/ou restaurar a diversidade natural/biológica (biodiversidade), não deixando de utilizar os recursos disponíveis, mas fazendo-o de modo a que as gerações vindouras possam também usufruir das mesmas (Ferreira & Saraiva, 2006).

Tendo por base os pressupostos anteriormente referidos, os jardins botânicos foram considerados como as primeiras entidades implicadas na conservação *ex-situ* dos recursos genéticos, nomeadamente pela implementação de colecções de plantas, e estabelecimento de bancos de germoplasma (Draper *et. al.*, 2004).

O papel dos bancos de germoplasma ou bancos de sementes têm-se intensificado ao longo dos anos, oferecendo como principais vantagens a facilidade de armazenamento, economia de espaço e capacidade de manter boas quantidades de amostras a um custo economicamente viável (BGCI, 2000).

Ao longo da existência dos bancos de sementes tem-se verificado uma progressiva diferenciação, ou seja, em anos passados cerca de 90% das sementes conservadas eram de interesse alimentar e com importância económica. Como exemplo de tal facto, temos o Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV) criado em Braga no ano de 1977 com o Programa de Melhoramento de Milho, prosseguindo em 1993 com a fundação do Banco Mediterrânico de Milho. A sua missão tem sido a de promover a colheita, conservação e

valorização dos recursos genéticos vegetais, por forma a garantir a diversidade biológica e a produção agrícola sustentável na actualidade e no futuro (INRB, 2012).

Na década de 70, do século passado, começaram a dedicar-se de uma forma especial à conservação de sementes de plantas autóctones, utilizando critérios orientadores para a selecção do material, tais como: raridade, ameaça, vulnerabilidade ou endemidade, numa perspectiva da preservação da biodiversidade (Bacchetta *et al.*, 2008).

Em Portugal, associados aos jardins botânicos são criados vários Bancos de Sementes (BS), tais como o BS de Coimbra - Universidade de Coimbra; o BS António Luís Belo Correia - Museu Nacional de História Natural/ Universidade de Lisboa; o BS do Jardim Botânico Tropical-Instituto de Investigação Científica Tropical I.P./Ministério dos Negócios Estrangeiros e mais recentemente o BS Professor João de Amaral Franco – Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa.

Nos bancos de sementes, as sementes colhidas passam a chamar-se registo. Cada uma constitui uma amostra de um lote de germoplasma, colhido para determinada espécie e população definida, ficando desta forma identificada (Bacchetta *et al.*, 2008).

Para a conservação das sementes são recomendadas várias etapas (ENSCONET, 2009a; Hong & Ellis, 1996; Smith *et. al.*, 2003), a saber:

- Limpeza e detecção de sementes danificadas, sendo essencial a determinação de sementes viáveis através de “teste de corte”, análise raio-X ou teste de tetrazólio;
- Determinação do conteúdo em água e secagem da semente. Antes e após da secagem deverão ser realizados teste de germinação para que se possam identificar os efeitos desta na capacidade de germinação das sementes;
- Acondicionamento - colocação das sementes em recipientes adequados garantindo assim o grau de humidade apropriado e a sua consequente longevidade;
- Armazenamento - tendo em conta as temperaturas recomendadas para a conservação. Deve realizar-se um teste de germinação um mês depois desta etapa.
- Testes de germinação realizados ao longo do tempo de conservação, por forma a determinar a viabilidade do registo.
- Regeneração/multiplicação das colecções (quando necessário).

Aquando da realização dos testes de germinação poderá ser necessário sujeitar as sementes a pré-tratamentos com o objectivo de quebrar a dormência, visto algumas sementes não germinarem apesar de colocadas em condições óptimas de germinação e de serem viáveis.

Verifica-se a existência de vários tipos de dormência em sementes de muitas espécies autóctones. No caso de sementes da família Cistaceae, Fabaceae e Malvaceae verifica-se uma dormência física, sendo necessário proceder ao pré-tratamento de escarificação, que pode ser mecânica, térmica ou química, com o objectivo de romper o tegumento impermeável das sementes (ENSCONET, 2009a).

No que diz respeito às famílias Scrophulariaceae e Umbelliferae podem ocorrer dormências de origem morfológica, fisiológica ou morfofisiológica (Baskin & Baskin, 2001), para as quais se podem aplicar vários pré-tratamentos, nomeadamente a estratificação ou a aplicação de ácido giberélico (Baccheta *et al.*, 2008).

Com a realização deste trabalho procurámos contribuir para um melhor entendimento dos processos de conservação das sementes, nomeadamente através do estudo de testes de germinação permitindo a monitorização das colecções de plantas autóctones conservadas em bancos de sementes.

Mais especificamente, teve como objectivo principal a selecção dos tratamentos de pré-germinação e selecção da temperatura óptima aplicando quatro regimes de temperatura, os quais podem maximizar a germinação de cada uma das espécies.

Deste modo, a primeira parte do trabalho permitirá situar em termos teóricos o nosso estudo, fazendo uma revisão de literatura sobre o tema que nos propomos investigar. Posteriormente, serão descritos os procedimentos metodológicos que servem de fundamento a esta investigação e a apresentação de resultados. Para finalizar serão discutidos os resultados e apresentadas as conclusões desta investigação.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

A biodiversidade assume um papel crucial para a espécie humana, uma vez que aproximadamente 40% da economia mundial e 80% das necessidades dos povos dependem dos recursos biológicos (MAOT, 2000, 2001). Pode ser utilizada como medida básica do impacto humano no planeta e é um indicador por excelência do grau de sustentabilidade das nossas sociedades (Rosa, 2002).

Mais de 20% das 380 000 espécies de plantas do mundo estão em risco de extinção (Gilbert, 2010), o que confirma a suspeita que muitas outras espécies vegetais desconhecidas terão desaparecido antes de serem identificadas e das suas propriedades serem avaliadas, nomeadamente ao nível dos princípios activos para uso medicinal/farmacológico (Alegria, 2001).

As extinções de espécies são a clara indicação de que os sistemas mais amplos (comunidades, ecossistemas) estão a ser afectados pelo homem com consequências imprevisíveis e irreversíveis (Ferrand de Almeida, 1994; Martínez, 2000). Relativamente à flora europeia estima-se que a destruição do habitat pela actividade humana seja a primeira causa de risco de perda de cerca de 83% das espécies ameaçadas (Sharrock & Jones, 2009).

Os factores que contribuem para a perda de biodiversidade são bem conhecidos, tais como: a degradação e destruição dos habitats resultante das alterações do uso do solo (e.g. conversão e intensificação dos sistemas de produção, abandono de práticas tradicionais, construção, incêndios); a sobreexploração, a propagação de espécies alóctones invasivas; a poluição; a procura de infra-estruturas para os sectores da habitação e dos transportes (Pinho *et al.*, 2003; CCE, 2006). Também as alterações climáticas são factores importantes que podem acarretar a extinção de muitas espécies (Davis & Shaw, 2001; Truiller *et al.*, 2005).

Segundo o Relatório Nacional de Aplicação da Directiva Habitats: 2001 a 2006, coordenado pelo Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB, 2008), Portugal reconhece que das 200 espécies inventariadas, cerca de aproximadamente 20% do total

das espécies da flora (espécies da Macaronésia) apresentam uma avaliação global favorável, estando aproximadamente 80% das espécies ameaçadas.

Com o aumento da perda natural de habitats a ênfase tem sido colocada na importância da conservação das populações de plantas *in situ* para a manutenção da diversidade genética (Waldren *et. al.*, 2000).

A Convenção da Diversidade Biológica publicou a Estratégia Global para a Conservação das Plantas. Este documento reúne em cinco grandes grupos 16 metas a atingir até ao ano de 2020 (BGCI, 2010).

Embora todos os grupos sejam muito importantes destaca-se, no âmbito deste trabalho, o grupo que agrega as metas no âmbito da conservação da diversidade das plantas:

- Meta IV – Conservar pelo menos 15% das regiões ecológicas do mundo;
- Meta V – Assegurar a protecção de 75% das mais importantes áreas de diversidade das plantas;
- Meta VI – Defender que em pelo menos 75% dos campos cultivados sejam utilizadas práticas que concorram para a conservação da diversidade das plantas;
- Meta VIII – Conservar 75% das espécies ameaçadas em colecções *ex situ*, das quais 20% devem utilizadas em programas de recuperação através de acções *in situ*;

No contexto da conservação da biodiversidade, e apesar da necessidade de conhecer melhor a flora existente, o Homem passa a saber o valor dos recursos naturais e conservá-los (Adams *et al.*, 2004).

2.2. ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

De acordo com Dajoz (2005), a diversidade genética, está na origem das respostas evolutivas e adaptativas dos seres vivos perante as modificações do meio.

A estrutura genética da população determina a capacidade de resposta à selecção natural, bem como declara considerações importantes para a formulação de estratégias para a colecção e conservação da biodiversidade (Hayward & Sackville, 1997).

A selecção das espécies com fins de conservação das suas sementes pode obedecer a critérios biológicos, ecológicos ou outros (Maxted & Guarino, 2004). No Quadro 1 apresenta-se de forma resumida alguns dos critérios.

Quadro 1

Critérios biológicos, ecológicos para priorizar as espécies com fins de conservação *ex situ* e recuperação ecológica (Gold *et. al.*, 2004).

Critério	Estados de critério
Forma de armazenamento de sementes. Esta informação é desconhecida para a maioria das plantas, embora as sementes possam ser colhidas para investigar a forma mais eficaz de armazenamento.	Ortodoxa Intermédia Recalcitrante Desconhecido
Estado de conservação de plantas É um dos critérios mais relevantes no momento de priorizar as espécies a conservar <i>ex situ</i> , sendo definido nomeadamente pelo IUCN.	Extinto Em perigo de extinção Vulnerável Pouco conhecido Fora de perigo
Forma de vida Dá prioridade a uma particular forma de vida.	Anuais Perenes herbáceas e geófitas Perenes lenhosas Árvores e arbustos
Listas ecológicas Quando é necessário o conhecimento das espécies de plantas que integram uma comunidade, identificando-as, bem como as suas relações com o ecossistema (e.g. plantas fixadoras de azoto, alimentação para animais em vias de extinção).	Espécies com potencial para recuperação de solos Espécies chave Espécies ecologicamente associadas a espécies raras ou úteis Espécies dominantes
Origem Esta informação pode estar disponível em listas, catálogos nacionais ou base de dados de flora.	Plantas endémicas (região) Plantas endémicas (país) Plantas nativas Plantas introduzidas
Distribuição geográfica de espécies Para a maioria dos países esta informação é obtida a partir de bases de dados de herbários nacionais, publicada em floras e catálogos da região.	As espécies distribuídas pelos quadrantes: 1 Grau de latitude 2 Graus de latitude 3 Graus de latitude Mais de 3 Graus de latitude

Quadro 1 (continuação).

Critérios biológicos, ecológicos para priorizar as espécies com fins de conservação *ex situ* e recuperação ecológica (Gold *et. al.*, 2004).

Critério	Estados de critério
Unicidade taxonómica As famílias ou géneros mono-específicos (com uma só espécie), revelam elevada prioridade, pois se desaparecer a espécie, desaparece também a linha evolutiva de nível superior.	Famílias mono-específicas Géneros mono-específicos Famílias multi-específicas Géneros multi-específicos
Uso actual ou potencial O conhecimento sobre o uso de plantas é normalmente mantido pelas comunidades locais, ou está disponível em publicações etnobotânicas, ou bases de dados institucionais. As espécies relacionadas com as plantas cultivadas podem ter um uso potencial, tal como: ornamental, alimentar, forrageiro, medicinal, aromático, tintura, madeira, etc.	Uso actual reconhecido Uso potencial reconhecido Sem uso conhecido

A conservação dos recursos fitogenéticos pode fazer-se de várias formas, que se diferenciam em conservação *in situ* e *ex situ*, permitindo a manutenção do germoplasma que se define por qualquer material capaz de transmitir os caracteres hereditários de uma geração a outra (Witt, 1985).

Para os autores Maxted *et. al.* (1997), a conservação da biodiversidade é um processo complexo, que deve dar prioridade às espécies mais ameaçadas. Neste contexto, propuseram um modelo que resume o procedimento a desenvolver quando se pretende proceder à conservação genética, tal como se apresenta na Figura 1.

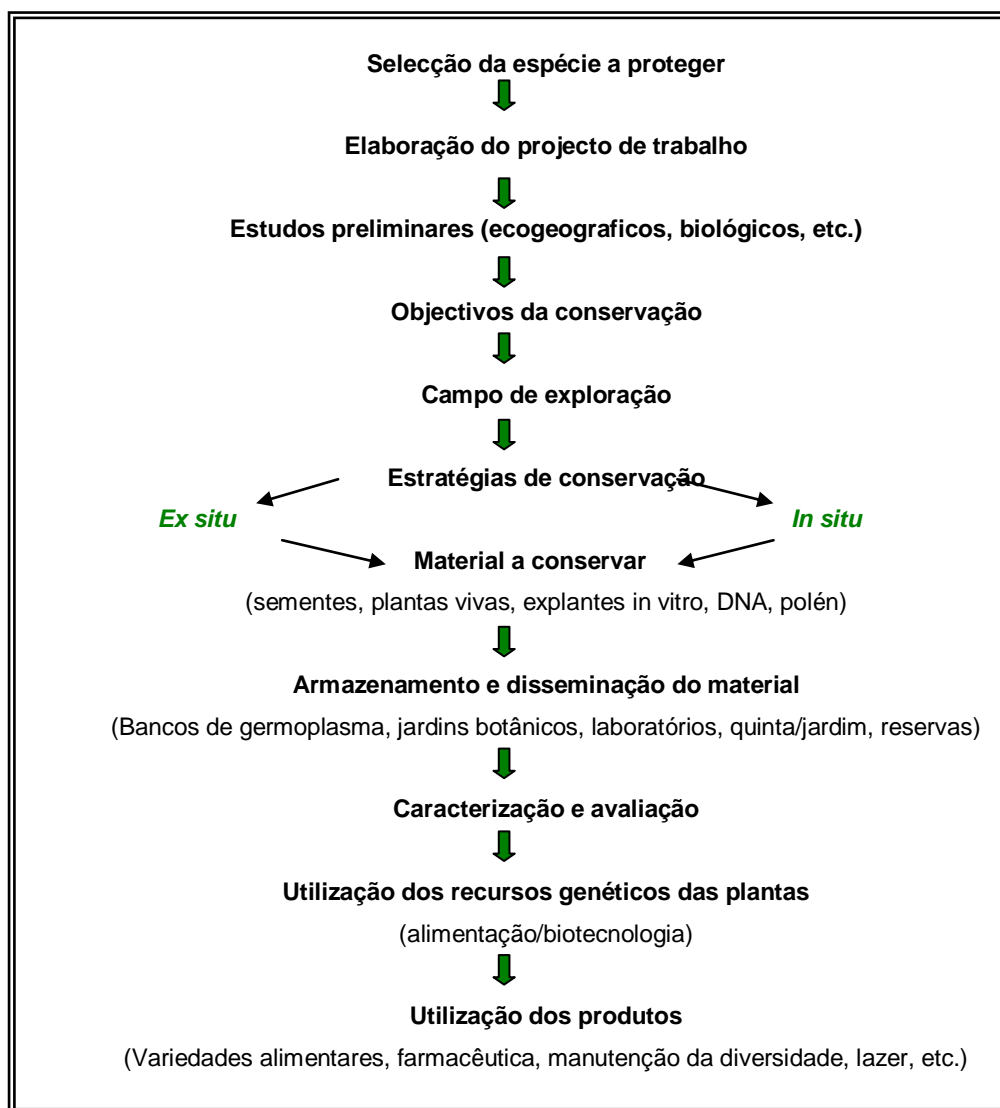


Figura 1

Modelo proposto por Maxted *et al.* (1997), para a conservação genética.

2.3. CONSERVAÇÃO *EX SITU*

A conservação *ex situ* pode realizar-se através do recurso a diversas técnicas, cuja finalidade máxima é a conservação de colecções vegetais fora do seu habitat natural, na forma de plantas completas, sementes, pólen, propágulos vegetativos, tecidos ou mesmo cultura de células (Frankel *et. al.*, 1995).

De acordo com o Botanic Gardens Conservation International (BGCI, 2000), este tipo de conservação tem como principais objectivos possibilitar a pesquisa da conservação biológica, recuperar germoplasmas ameaçados e aumentar a quantidade de germoplasma armazenado. Também contribui para a diminuição da pressão da colheita *in situ*, e possibilita a reintrodução de espécies vegetais e recuperação e gestão de habitats.

Os jardins botânicos desempenham um papel muito importante na pesquisa científica, na educação e na conservação da variabilidade genética das espécies vegetais, contribuindo para a conservação *ex situ* (Hawkins, 2008; Heywood, 1994; Wyse Jackson & Akeroyd, 1994; Woodland, 1997).

A existência de cerca de 2500 jardins botânicos no mundo é particularmente importante por permitir a conservação de cerca de 4 milhões de espécies vegetais, como plantas vivas, constituindo assim as colecções botânicas.

Após a publicação da Agenda Internacional para a Conservação nos Jardins Botânicos (BGCI, 2000) foram divulgadas as prioridades de acções a implementar, nomeadamente, o desenvolvimento de actividades na área da estratégia de conservação da biodiversidade; do trabalho em rede; da cooperação científica e técnica; do património cultural e da conservação *ex situ*.

A conservação *ex situ* complementa as acções desenvolvidas no terreno, sendo muito importante a contribuição dada pelos jardins botânicos, através da integração dos bancos de germoplasma, nomeadamente os bancos de sementes.

Os bancos de germoplasma foram idealizados para apoiar os programas de melhoramento de plantas, dedicando-se essencialmente à conservação de espécies cultivadas, principalmente as alimentares, mas cada vez mais as preocupações com a conservação das plantas autóctones, nomeadamente as que estão em vias de extinção têm vindo a ser protegidas nestas infra-estruturas (Goulão *et. al.*, 1998).

Existem vários modelos de bancos de germoplasma (Bernejo, 1994; Maxted *et al.*, 1997; Red de Jardines Botânicos, 2001), que se podem identificar como:

- Colecção no campo – Colecção em que as plantas se conservam em cultivo. É usada essencialmente para as espécies que se propagam por via assexuada (e.g. tubérculos, rizomas, bolbos), em virtude destas, não produzem sementes com

facilidade ou as sementes produzidas perderem rapidamente a sua viabilidade quando sujeitas a secagem com o nível crítico variável entre os 20% a 50% de humidade relativa e a baixas temperaturas de conservação a 5°C. Estas sementes são recalcitrantes (Bacchetta *et al.*, 2008).

- Colecção *in vitro* ou Banco de tecidos – São utilizadas técnicas de cultivo *in vitro* para conservar plantas, tecidos ou suspensões celulares de *taxa* que apresentam problemas de propagação muito especiais, mediante repicagens sucessivas. É também um método alternativo que permite conservar sementes recalcitrantes, ou espécies com baixa produção de sementes férteis, evitando incidentes climatéricos, outros desastres naturais ou mesmo ataque por agentes patogénicos. Permite igualmente a obtenção de um elevado número de unidades num relativo curto espaço de tempo. É necessário, no entanto, pessoal especializado e instalações onerosas.
- Bancos de germoplasma (*stricto sensu*) – Conservam em recipientes de volume muito limitado, sementes, esporos de Ptéridofitos, pólen, bolbos, ou outros propágulos vegetais, em condições controladas, que asseguram a conservação da viabilidade por períodos de duração variável. Eis alguns exemplos:

Bancos de pólen – Permitem a conservação do pólen, muitas vezes usado na realização de cruzamentos, visto ser portador de grande diversidade genética. Conserva-se a baixa temperatura e a baixo teor de humidade (entre 10 e 30%).

Bancos de sementes – Sistema óptimo para conservar espécies com sementes que mantêm a sua faculdade germinativa por longos períodos. São conservadas a baixas temperaturas e com baixo teor de humidade (sementes ortodoxas) (Bacchetta *et al.*, 2008).

De acordo com Wyse Jackson e Akeroyd (1994), as sementes são um meio prático de conservar a diversidade genética a longo prazo pois possibilitam amostras de pequena dimensão, fáceis de manipular, necessitam de poucos cuidados de manutenção e apresentam-se viáveis durante muito tempo, dezenas a centenas de anos.

Para Relf e Ball (2001), a reprodução sexuada permite assegurar a conservação dos caracteres genéricos e específicos das plantas, embora a sua componente varietal se revele

heterogénea. Esta apresenta, segundo Boutherin e Bron (2000), bastantes vantagens, mas também algumas desvantagens, como se pode observar no Quadro 2.

Quadro 2
Vantagens e desvantagens da reprodução sexuada
(Adaptado de Boutherin & Bron, 2000).

Vantagens
Grande maior parte das espécies multiplicam-se por semente;
Conservação fácil dos grãos;
Técnica simples e rápida;
Limitação de transmissão de doenças, principalmente de origem viral;
Elevado n.º de sementes pode ser obtido em poucos pés-mães;
Permite a obtenção de novas cultivares (melhoradas e mais adaptadas ao meio).
Desvantagens
Períodos longos até à floração;
Em certas espécies, é muito difícil de propagar.

2.4. PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO DE UM BANCO DE SEMENTES

A eficácia das actividades de colheita/recollecção do banco de sementes depende de uma planificação das acções apropriadas, tendo em conta a médio-longo prazo o material a recolher em função do seu grau de ameaça de desaparecimento, importância económica, procura dos investigadores ou melhoradores (Villamil & Laborde, 2001).

A conservação de sementes realizada nos bancos de sementes é concretizada através do seguimento de determinados processos que se podem dividir em três fases principais, conforme se ilustra seguidamente no Quadro 3.

Quadro 3
Elementos principais nos processos de conservação de um banco de sementes
(Adaptado de Smith *et. al.*, 2003).

Planeamento e Colheita	Planeamento e autorizações ↓ Colheita de sementes e <i>vouchers</i> etiquetados e registo de dados de campo ↓ Expedição rápida para o banco de sementes ↓
Processamento e Testes	Inspeção de problemas, secagem e montagem de <i>vouchers</i> ↓ Criação de registos de dados para cada colecção ↓ Avaliação da tolerância à desidratação (se desconhecida) ↓ Limpeza das sementes ↓ Análise de raio-X ou “teste de corte” ↓ Determinação da quantidade de sementes ↓ Secagem ↓ Determinação do conteúdo em água ↓ Teste de germinação inicial ↓
Armazenamento e Utilização	Acondicionamento e duplicação ↓ Armazenamento no frio ↓ Caracterização e avaliação ↓ Distribuição de sub-amostras caracterizadas aos utilizadores (ao longo do tempo) ↓ Testes de germinação (ao longo do tempo) ↓ Regeneração/multiplicação das colecções (quando necessário)

Para desenvolver o seu objectivo principal de conservação da biodiversidade sob a forma de sementes, o banco de sementes deverá ter um herbário associado e várias instalações apropriadas à limpeza e caracterização das sementes, germinação, secagem e armazenamento (Figura 2).

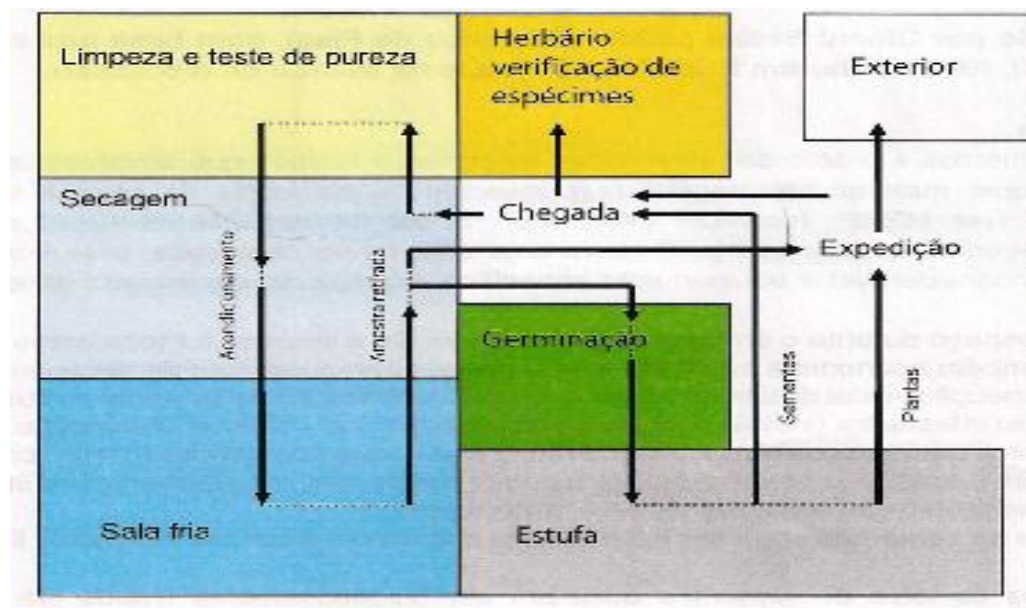


Figura 2

Diagrama dos principais processos e instalações de um banco de sementes (ENSCONET, 2009a).

Nos bancos de sementes, as sementes conservadas são agrupadas em diferentes tipos de colecções, tais como:

- Colecção base (*Base collection*). Onde a conservação das espécies se faz a longo prazo, em período igual ou superior a 50 anos. Esta reserva de sementes não é distribuída (ENSCONET, 2009a), verificando-se a existência de duplicados em outros bancos de germoplasma. A conservação a temperatura inferior a 0°C, frequentemente entre -18 e -20°C, permite o armazenamento da maioria das sementes ortodoxas (Rao *et. al.*, 2006).
- Colecção activa (*Active collection*). Onde a conservação é de curto a médio prazo. As sementes desta colecção podem ser distribuídas e utilizadas (ENSCONET, 2009a), mediante acordos de transferência de material, em concordância com os objectivos propostos (e.g. investigação - *Index Seminum*, melhoramento, reintrodução e reabilitação de habitats, educação). As sementes assim conservadas podem ser mantidas a temperaturas entre 0° e 15°C (frequentemente 5°C) e com conteúdos de humidade entre 3 e 7%, apresentando uma viabilidade não menor que 65% (Jaramillo & Baena, 2000).

- Colecção de trabalho (*Working collection*). Também chamada colecção do melhorador (Jaramillo & Baena, 2002).
- Colecção núcleo (*Core collection*). É segundo Jaramillo e Baena (2002) uma sub-colecção de germoplasma de uma dada espécie, onde está representada a maior parte da variabilidade genética da mesma.

Sendo as colecções de trabalho e núcleo mais utilizadas em bancos de sementes agronómicos.

2.4.1. COLHEITA E LIMPEZA DAS SEMENTES

A colheita das sementes é um processo importante, no qual deve participar pessoal especializado, e deve atender ao momento mais favorável para a efectuar. Pode fazer-se manual ou mecanicamente, dependendo da semente e do seu calibre (Boutherin & Bron, 2000).

Antes da colheita, recomenda-se a realização de uma prospecção preliminar para observar as potenciais populações, confirmando assim a identificação das espécies e determinar a época de produção de sementes para estimar a data favorável da colheita. Quando a recomendação anterior não for possível, devem ser utilizadas informações recolhidas nas bases de dados dos herbários, floras, ou inclusive auscultar os naturais das localidades que poderão contribuir com o seu saber (Gold *et al.*, 2004).

No momento da colheita as sementes deverão apresentar um grau de maturidade adequado e conter o menor teor de humidade possível. Existem indicadores morfológicos da fase de dispersão natural das sementes, que embora possam não ser sempre esclarecedores, podem contribuir para determinar o momento mais propício para a sua colheita, tais como: a dispersão presente de algumas sementes; mudança de cor do fruto ou semente; deiscência do fruto; grau de dureza dos tecidos das sementes (Gold *et al.*, 2004).

Também é importante planificar a amostragem das sementes a colher, de forma a maximizar a diversidade genética, assim e tendo em conta o número de sementes por fruto e o número de frutos por planta, pode estimar-se se a quantidade de sementes

potencialmente existente é suficiente para fins de conservação e também para definir a estratégia de amostragem.

A amostra de sementes colhida para conservação a longo prazo requer uma quantidade de sementes suficiente para a sua caracterização, nomeadamente para a realização de testes de viabilidade, monitorização periódica, distribuição de amostras para investigação e apoio a programas de recuperação ecológica ou reintrodução de espécies, regeneração da amostra e duplicação da amostra em outro banco de sementes por questões de segurança (Gold *et al.*, 2004).

A quantidade de sementes viáveis adequada para os seus potenciais usos ainda não é unânime. No quadro 4 apresentam-se duas recomendações segundo os autores Gold *et al.*, (2004) e a ENSCONET (2009b).

Quadro 4

Quantidade de sementes viáveis, por amostra requeridos para determinados fins.

	Gold <i>et al.</i> , 2004	ENSCONET 2009b
Potencial uso	Número de sementes	
Conservação a curto prazo e para mostruário.	300	5000
Quantidade mínima para conservação e para estabelecer uma potencial população representativa da população original	500	1000
Desenvolvimento de protocolos efectivos de germinação	1.000	1250
Monitorização de testes de viabilidade da amostra conservada a longo prazo (mais de 100 anos).	2.000	600
Duplicação da registo num segundo banco de sementes.	5.000	550
Distribuição de pequenas amostras para fins de investigação ou para multiplicação para posterior reintrodução no habitat.	10.000	1600
Distribuição de grandes amostras para propagação e posterior reintrodução.	20.000	

No que diz respeito à limpeza e separação das sementes dos frutos ou de outros fragmentos, deve fazer-se tendo em conta as suas características morfológicas e mecânicas, evitando danos mecânicos, ou outros que possam provocar a sua perda de viabilidade (Bacchetta *et al.*, 2008; ENSCONET, 2009a; Romero, 1989). Podem ser usados

vários métodos, tais como: passagem por sistema de vários crivos; separação por fluxo de ar; flutuação em líquido (pouco aconselhada) e separação electrónica, electrostática ou magnética.

2.4.2. SECAGEM DAS SEMENTES

A secagem visa maximizar a longevidade da maioria das sementes (ENSCONET, 2009a). Tem como principal objectivo diminuir o conteúdo hídrico das sementes para níveis mínimos da actividade metabólica, sem no entanto perderem a sua viabilidade, bem como reduzir o risco de contaminação por fungos ou outros fitófagos que possam adulterar a qualidade das sementes (Draper *et. al.*, 2004).

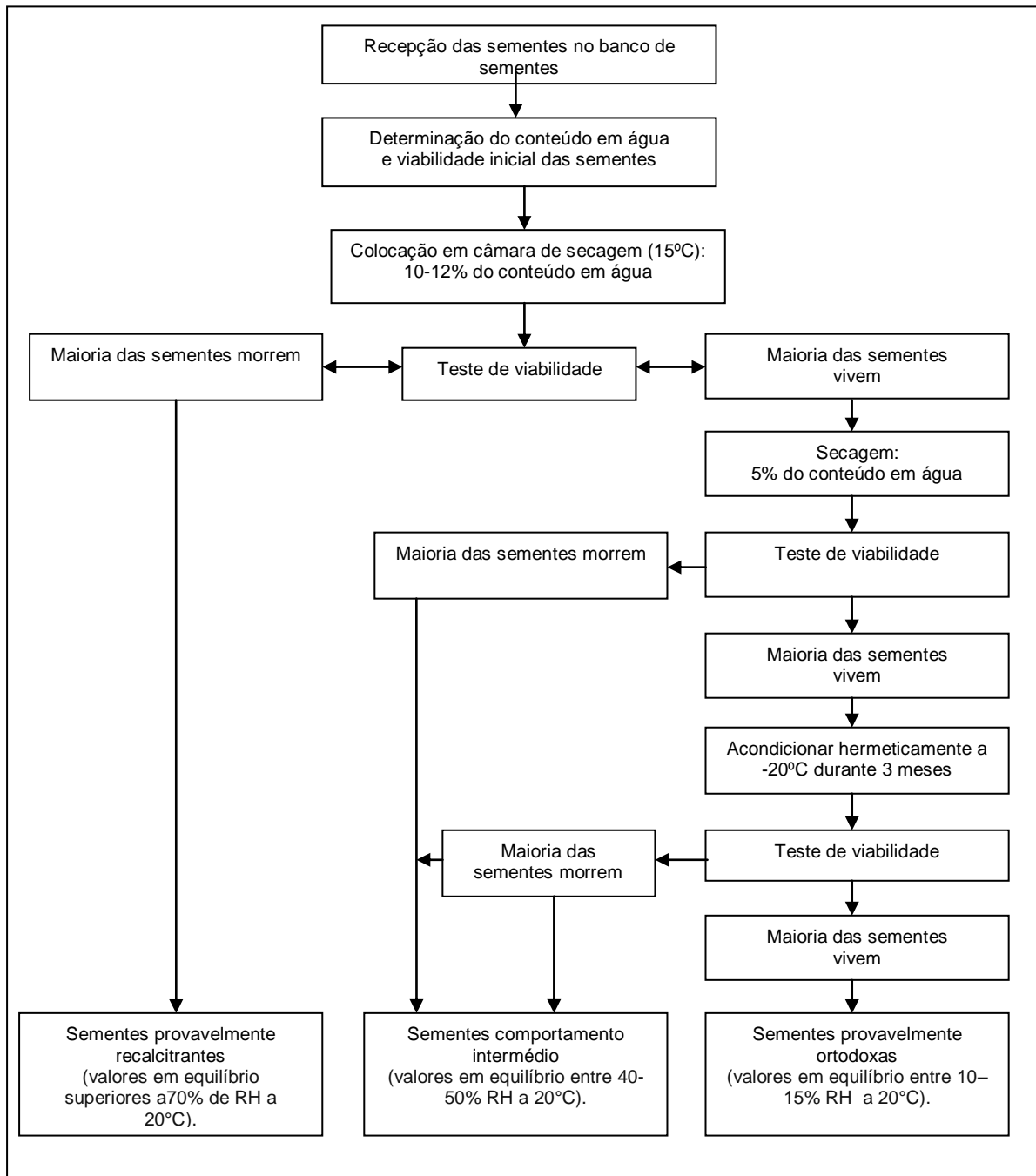
A velocidade de secagem está directamente relacionada com a circulação do ar nas sementes, ou seja, quanto maior for a circulação de ar, maior será a velocidade de extracção de água das sementes, aumentando o gradiente de humidade entre o ar exterior e a semente (ENSCONET, 2009a).

Draper *et. al.* (2004), refere o método utilizado no Banco de Sementes António Luís Belo Correia do Jardim Botânico – Museu Nacional de História Natural, que consiste na introdução das amostras numa câmara de secagem a baixa humidade entre 10 a 12% de Humidade Relativa (RH), com a temperatura média de 15°C e onde se verifica uma boa circulação de ar, permitindo deste modo que as sementes diminuam o seu conteúdo hídrico, entrando em homeostasia com a humidade da câmara.

A secagem é um procedimento chave na conservação de sementes. Neste contexto, Rao *et. al.* (2006) descrevem o protocolo para determinar o comportamento de conservação das sementes, apresentado por Hong & Elis em 1996 (Quadro 5).

Quadro 5

Protocolo para determinar o comportamento de conservação das sementes.



Fonte: Hong e Ellis (1996), citado por Rao *et al.* (2006).

As sementes ortodoxas mantêm a sua viabilidade após processo de secagem, quando o seu conteúdo em humidade se estabelece entre os 5-10% e as temperaturas inferiores ou iguais a 15°C (Alegria, 2001; Garcia & Villamil, 2001; Hong & Ellis, 1996). Já os valores referenciados pela ENSCONET (2009a) são de 15% de humidade relativa, apresentando as sementes 3,5 a 6,5% de conteúdo em água, dependendo do teor de óleo das mesmas.

As sementes recalcitrantes ficam danificadas de forma irremediável, quando sujeitas a situação de desidratação, tendo por limite crítico o conteúdo em humidade entre os 12 e os 30% (Chin & Roberts, 1980). A sua conservação pode durar apenas algumas semanas ou meses.

2.4.3. ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE SEMENTES

A determinação do número de sementes é fundamental para o planeamento do uso das colecções, nomeadamente para testes de germinação, duplicação, acções de conservação ou regeneração e outros. Para o cálculo da estimativa da quantidade de sementes é recomendado o seguinte procedimento: Pesar todo o lote de sementes; Pesar cinco amostras de 50 sementes; Calcular o peso médio de 50 sementes; Calcular o limite superior do intervalo de confiança a 95% (LSIC) e estimar o número total de sementes, através do cálculo do peso total do lote de sementes/LSIC x 50 (ENSCONET, 2009a).

2.4.4. ACONDICIONAMENTO DAS SEMENTES

Depois do processo de secagem as sementes têm que ser acondicionadas em embalagens cuja hermeticidade seja garantida, para que não se verifique a absorção de humidade pelas sementes, o que condicionaria negativamente a conservação a longo prazo das mesmas.

A escolha dos recipientes para o armazenamento das sementes depende das suas características, do tempo estimado para as conservar e das condições de conservação (Jaramillo & Baena, 2000).

Os bancos de sementes utilizam uma grande variedade de recipientes de diferentes materiais. Os recipientes de vidro são os mais aconselháveis, por serem transparentes e permitirem a observação quer das sementes, quer dos indicadores de humidade. Têm no entanto o inconveniente de serem pesados e frágeis. Os sacos de alumínio tri-laminado são também muito utilizados, embora sejam opacos e possam ser danificados por sementes com estruturas mais afiadas (Gold & Manger, 2008).

Com o objectivo de monitorizar a eficácia dos recipientes no decurso da conservação a longo-prazo de sementes, são introduzidos no seu interior pequenos sacos de sílica-gel na proporção volumétrica de 1/3 de sílica para 2/3 de sementes (Draper *et. al.*, 2004). O indicador de cor utilizado é o violeta de metilo, que tem cor laranja quando desidratado e passa a cor verde quando humedecido (Gómez-Campo, 2007).

O acondicionamento das sementes é influenciado também pela necessidade de manipulação dos lotes pelos bancos de sementes. Desta forma, a utilização de ampolas de vidro, obtidas a partir de tubos de ensaio fechados com recurso ao aquecimento por chama, são recomendadas para colecções de longo prazo, espécies raras e/ou endémicas (Bacchetta *et al.*, 2008). Para as colecções activas são requeridos recipientes que se possam abrir e fechar mais facilmente.

2.4.5. ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES

As técnicas de conservação a longo prazo visam, segundo Gómez-Campo (2002), retardar o mais possível o momento da morte da semente, permitindo aos bancos de sementes cumprir o seu objectivo de prolongar a longevidade das sementes.

Desde há muito que são conhecidos os dois factores essenciais para aumentar a longevidade das sementes: o baixo teor de humidade e a baixa temperatura (Desai *et. al.*, 1997). Também a baixa concentração de etileno e provavelmente o baixo teor em oxigénio contribuem para o sucesso da preservação das sementes a longo prazo (Gómez-Campo, 2007).

O autor “Harrington 1979” citado por Muñoz e Garcés (1994) enuncia que a cada redução do teor de humidade em 1%, duplica a vida da semente e a cada redução de 5°C de temperatura a longevidade da semente é igualmente duplicada.

Segundo Probert e Hay (2000), as sementes ortodoxas toleram grande desidratação, o que lhes que permitem serem sujeitas a temperaturas de conservação negativas, normalmente entre -18º e -20ºC. Podem ser conservadas durante anos ou mesmo séculos, dependendo da espécie.

Outras sementes, podem ser sujeitas a temperaturas ultra-baixas, a cerca de -196°C , em azoto líquido. A esta modalidade chama-se criopreservação/crioconservação, e é utilizada em sementes ortodoxas, com baixa longevidade, num sistema de conservação a longo prazo, sendo igualmente usada em pequenas amostras.

2.4.6. TESTES DE VIABILIDADE

A viabilidade das sementes de uma amostra define-se pelo número de sementes vivas e com potencial de originar novas plântulas normais, em condições ambientais favoráveis (Garcia & Villamil, 2001), sendo possível determinar através da utilização de testes de viabilidade (Gosling, 2003).

Os testes de viabilidade constituem-se como a forma de determinar se a semente está viva ou não, bem como permitem estimar a proporção de sementes vivas numa população (Gosling, 2003).

De acordo com a International Seed Testing Association (ISTA, 2006), existem várias formas para determinar a viabilidade das sementes:

- Testes de germinação, quando uma semente é viável e não apresenta dormência germinará quando sujeita a condições favoráveis de humidade, temperatura e luz, ou seja, a capacidade germinativa de um lote de sementes é um indicador directo da sua viabilidade (Garcia & Villamil, 2001).
- Ensaio topográfico com tetrazólio, é especialmente indicado para sementes que revelem dormência ou baixa velocidade de germinação. Consiste na coloração das células vivas do embrião, de vermelho, por redução do sal de tetrazólio. É um método destrutivo das sementes.
- Ensaio de excisão, que consiste em cortar e observar a cor e aspecto interior das sementes e avaliar o grau de desenvolvimento do embrião. É uma prova destrutiva e requer grande experiência para a interpretação da observação.

- Ensaio de contraste com raio-X, permite detectar sementes vazias, mal formadas ou danificadas. É um método não destrutivo da semente, e permite obter resultados mais rápidos e rigorosos, embora deva ser aplicado a uma sub-amostra para evitar eventuais efeitos genéticos (ENSCONET, 2009a).

Segundo Gómez-Campo (2009), as amostras devem ser regeneradas quando a sua viabilidade for menor que 85%, não se perdendo a noção que cada regeneração implica uma redução da diversidade genética, elevados custos (e.g. mão-de obra, necessidade de terreno e financiamento) e pode também originar cruzamentos indesejados.

2.4.7. TESTES DE GERMINAÇÃO

O principal objectivo dos testes de germinação é determinar o máximo de potencial da amostra de sementes para produzir plântulas normais e saudáveis. Permitem também identificar a percentagem de outras categorias de sementes, tais como as sementes não germinadas e as sementes mal formadas, bem como reconhecer a ausência de dormência ou a sua presença e o seu respectivo nível (Gosling, 2003).

Este método consiste na colocação da semente em condições de ambiente favoráveis de germinação. Quando estamos na presença de sementes não dormentes, estas apenas necessitarão de condições de temperatura, humidade e oxigenação adequadas para que possam germinar. No caso de sementes dormentes é necessário recorrer a tratamentos para a quebra de dormência (Gosling, 2003).

Segundo Bacchetta *et al.* (2008), os testes de germinação são muito importantes para uma correcta gestão das amostras presentes no banco de sementes, sendo utilizados para possibilitar a elaboração de protocolos de conservação eficazes para cada registo. Este conhecimento é utilizado interna e externamente com outros bancos, permitindo o cultivo eficaz da planta em laboratório ou em jardins botânicos, para que a planta complete o seu ciclo de vida, originando novas sementes. Este facto possibilita elaboração de planos de reintrodução ou reforço populacional, em condições óptimas de aproveitamento das sementes disponíveis.

Os testes de germinação são também essenciais como forma de controlar a qualidade dos lotes de sementes conservados, já que nos dão informação acerca da eficácia dos métodos utilizados para preservar a informação genética dos registos bem como, da viabilidade das sementes ao longo do seu processo de conservação, embora possa não constituir uma estimativa correcta da mesma.

A avaliação deste parâmetro torna-se então muito relevante para os Bancos de Sementes, pois a informação obtida permitirá uma utilização mais eficaz do lote de sementes, internamente ou externamente com a partilha e divulgação das condições óptimas de germinação de sementes aos futuros utilizadores.

A ENSCONET (2009c) recomenda a realização de testes de germinação no maior número de colecções exequíveis:

- Antes e após secagem – permitindo avaliar a tolerância das sementes ao processo de secagem;
- Antes do armazenamento - possibilita a determinação da estimativa inicial de viabilidade
- Um ano após o armazenamento - permite conhecer os efeitos do armazenamento.

Na verdade, quando se trabalha com espécies autóctones em que as amostras nem sempre têm grande quantidade de sementes, pode optar-se por realizar o 3.º teste (ENSCONET 2009c). É importante que a viabilidade seja elevada quando as sementes são armazenadas ou pelo menos que seja conhecida, pois condiciona a longevidade da amostra.

2.5. A SEMENTE

A semente constitui a parte inicial e a finalidade do ciclo de vida de todas as plantas superiores, estando muitas vezes encerrada num fruto (Ferri, 2004). Representa a estrutura mais evoluída das plantas superiores que permite a perpetuação da espécie, funcionando igualmente como meio de dispersão frequente e eficaz, revelando elevada capacidade de regenerar uma nova planta vascular completa a relativamente longo prazo (Witt, 1985).

A semente é constituída por:

- Tegumento, que tem a função de protecção. Muitas vezes permite a conservação da semente, por inibir a sua germinação;
- Embrião, que é originado pelo crescimento do zigoto após a fecundação e apresenta formas muito variáveis. O embrião é formado pela radícula, o caulículo e a gémula;
- Endosperma, tecido de reserva normalmente constituído por glícidos, lípidos e proteínas.

A estrutura da semente difere nas monocotiledóneas e dicotiledóneas (Figuras 3 e 4, respectivamente).

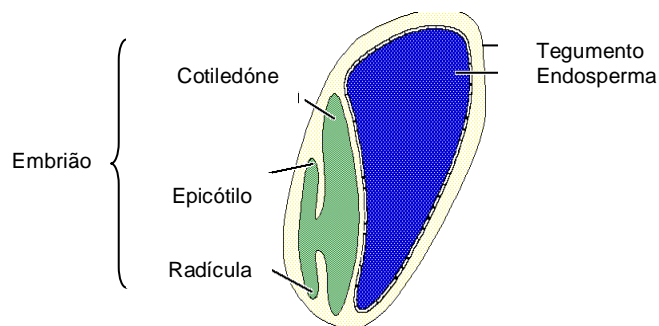


Figura 3
Esquema da semente monocotiledónea (DESAI *et al.*, 1997).

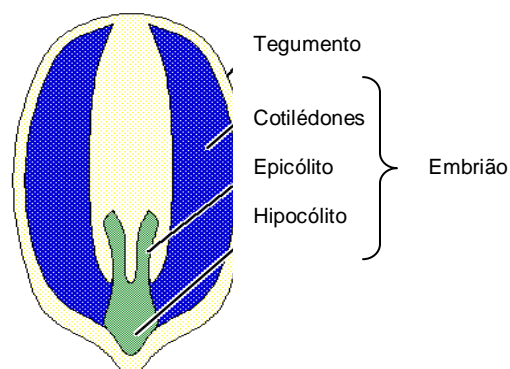


Figura 4
Esquema da semente dicotiledónea (DESAI *et al.*, 1997).

2.5.1. GERMINAÇÃO

A germinação é definida pela ruptura dos tegumentos da semente determinada pelo alongamento da radícula ou, na ausência dos tegumentos, um alongamento visível da mesma (Côme, 1970).

Este fenómeno só ocorre em condições ideais, nomeadamente em meio suficientemente húmido (para que ocorra a imbibição), presença de oxigénio (salvo em casos particulares) temperatura óptima, e presença ou ausência de luz, que varia de espécie para espécie (Baskin, & Baskin, 2001; Boesewinkel & Bouman, 1995; Maciel, 1994).

Quando iniciado o processo germinativo torna-se irreversível, a semente ou germina ou morre (Caixinhas, 1988).

O processo fisiológico de germinação (ver Figura 5), desencadeia uma sequência de trocas metabólicas, que incluem: a activação da respiração, a síntese proteica, a mobilização das reservas e a divisão e crescimento celular. O embrião provoca a ruptura do tegumento da semente originado pela emergência da radícula (Pilar & Moysset, 1993).

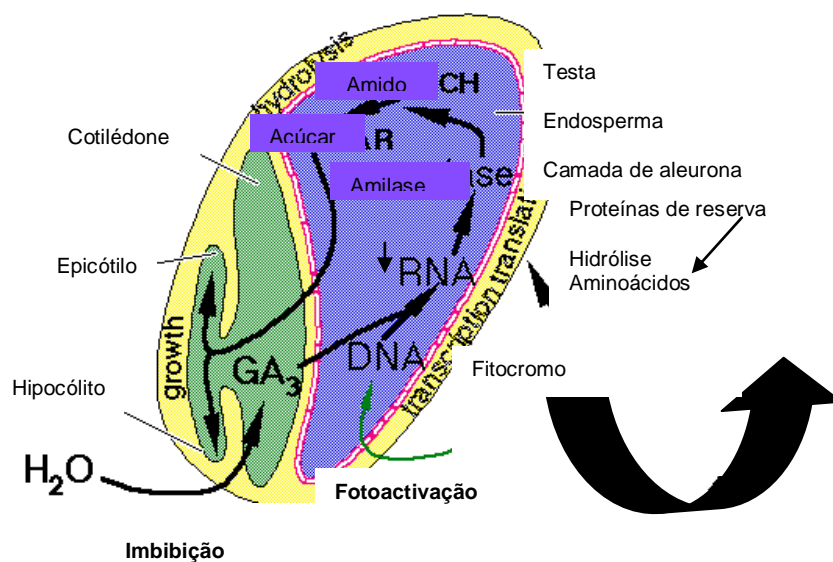


Figura 5
Processo fisiológico da germinação (DESAI *et al.*, 1997).

Numa primeira fase, a germinação é caracterizada por um grande aumento do volume da semente, devido à intensa entrada de água pelo processo físico da imbibição (Ferri, 2004). Esta fase pode ser afectada pelo défice ou excesso de água, a velocidade de hidratação e ainda a temperatura a que a imbibição ocorre (Villamil & Garcia, 1998).

Na segunda fase - Germinação *stricto senso* – fase de activação variável de acordo com as espécies, as enzimas hidrolíticas e as hormonas produzidas começam a digerir as substâncias de reserva da semente e ocorre a sua translocação para as áreas de desenvolvimento do embrião (Riley, 1987). Nas sementes não se manifesta ainda qualquer evolução morfológica e a absorção de água é nula nesta fase (Caixinhas, 1988). No entanto ocorre a re-activação dos processos inerentes ao desenvolvimento como a transcrição de DNA, a síntese proteica, aumentando igualmente as taxas metabólicas e respiratórias, que ficaram inactivas quando a semente atingiu a maturidade (Barceló Coll *et. al.*, 1992; Viegas & Cecílio, 1998).

Na terceira fase, o tegumento não consegue acompanhar todo o aumento do volume interno e por isso ocorre o seu rompimento. Primeiramente sai a radícula, que por ter geotropismo positivo, penetra verticalmente no solo, onde se ramificará dando origem ao sistema radicular.

O crescimento é marcado por um aumento de absorção de água e pelo alongamento da radícula.

2.5.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

A germinação das sementes requer a presença de determinadas condições favoráveis, para que possa ocorrer de forma adequada (Copeland & McDonald, 1995; Kelly, 1996; Relf & Ball, 2001), e que são:

- Semente - deve estar viva, conter um embrião maduro e o endosperma suficiente para sustentar o desenvolvimento do embrião durante a germinação.
- Água – a sua presença é um factor essencial para que ocorra a germinação, pois a re-hidratação rompe o tegumento, permitindo o crescimento da radícula.

Também determina muitas vezes a quebra de dormência e o início da actividade metabólica pela activação enzimática e translocação.

- Oxigénio – a disponibilidade do oxigénio é imprescindível durante a fase de germinação, embora a quantidade necessária do mesmo varie consoante as espécies (Bacchetta *et al.*, 2008).
- Temperatura – deve ser compatível com as exigências particulares de cada espécie e actua principalmente sobre a velocidade das reacções bioquímicas e a velocidade de germinação (Galmés *et. al.*, 2006). A temperatura óptima de germinação permite obter a maior percentagem de germinação num período mais curto. No caso das espécies mediterrânicas a temperatura óptima ocorre normalmente entre 15°C e 20°C (Thanos *et. al.*, 1989), ou entre os 25°C e 30°C, no caso de sementes autóctones da montanha Mediterrânea (Serrano-Bernardo *et. al.*, 2007).

A temperatura pode afectar a capacidade de germinação das sementes, por meio dos seus efeitos sobre a deterioração da semente, a perda de dormência ou no processo da germinação (Roberts, 1988).

- Luz – a duração da disponibilidade da luz (fotoperíodo) e a qualidade de luz são dois factores importantes para a germinação das sementes. Na germinação de algumas espécies, a estimulação com luz vermelha (660 nm) sujeita o embrião da semente a adoptar uma forma inactiva do fitocromo, o que estimula a germinação (Bacchetta *et al.*, 2008).

2.5.3. IMPEDIMENTOS À GERMINAÇÃO: DORMÊNCIA

A dormência pode definir-se como a presença de mecanismos que impedem a germinação da semente, embora esta seja viável. A semente poderá assim resistir a diversos factores ambientais adversos, garantindo desta forma, que a germinação só ocorra numa fase propícia ao desenvolvimento de uma nova planta (Bacchetta *et al.*, 2008; Baskin & Baskin, 2001).

A dormência funciona como meio de otimizar a distribuição da germinação no tempo (dispersão no tempo) e facilitando a dispersão das sementes no espaço, apresentando grande importância do ponto de vista ecológico, por permitir a germinação durante um longo período de tempo (García & Villamil, 1999) ou seja, a população pode-se ir libertando esporadicamente da dormência, exibindo uma germinação irregular. Revela-se então o elevado valor biológico deste factor, por contribuir para o prolongamento no tempo no que diz respeito à propagação bem como à sobrevivência das espécies (Maciel, 1994; Fenner, 2000).

Existem vários tipos de dormência (Barceló Coll, *et al.*, 1992; Baskin & Baskin, 2001; Romero, 1989). Estes podem ser distinguidos da seguinte forma:

- Fisiológica – quando se verifica um impedimento mecânico do tegumento da semente (ou do fruto);
- Morfológica - originada pelo desenvolvimento incompleto do embrião. Neste caso, o período de dormência corresponde ao tempo de desenvolvimento do embrião;
- Morfofisiológica – combinação de um embrião não desenvolvido (ou indiferenciado) e fisiologicamente dormente;
- Física – quando existem impedimentos que actuam no pericarpo do fruto, ou no tegumento da semente que o tornam impermeável à água ou ao intercâmbio gasoso;
- Combinada (física + fisiológica) – provocada pela presença conjunta de dois ou mais mecanismos que afectam o embrião ou o tegumento (e.g. semente impermeável com um embrião fisiologicamente dormente);
- Química – Quando a semente não germina devido à presença de inibidores no pericarpo.

2.5.4. QUEBRA DA DORMÊNCIA

Na natureza, as sementes dispersas podem apresentar-se sob a forma quiescente ou dormente. A primeira é caracterizada pela pronta germinação das sementes na presença de condições favoráveis à germinação e a última, verifica-se quando as sementes são dispersas com alguma restrição a germinação. Este bloqueio pode ter origem endógena ou exógena da semente, necessitando de condições específicas para iniciar o processo de germinação (Cardoso, 2008).

Neste contexto, a quebra de dormência de sementes na natureza depende das suas características morfológicas e fisiológicas e da fenologia da espécie, bem como das condições bióticas e abióticas do ambiente (e.g. a disponibilidade de água, luz, temperatura e substrato sobre o qual a semente foi dispersa).

O estado fisiológico de dormência pode ser quebrado recorrendo a tratamentos que permitem alterá-lo artificialmente, recriando as condições naturais em laboratório (Boutherin e Bron, 2000), tais como:

- Eliminação de estruturas vegetais (brácteas, glumas).
- Escarificação mecânica – Tratamento que consiste no desgaste do tegumento da semente, de forma a permitir a penetração da água e as trocas gasosas. Pode fazer-se por agitação das sementes sozinhas ou com areia, por abrasão com lixa, por recurso a correntes de ar onde as sementes são projectadas sobre superfícies rugosas, ou por corte do tegumento com bisturi. Este tratamento permite quebrar a dormência física.
- Escarificação química – As sementes são mergulhadas em soluções de líquidos corrosivos, por exemplo ácido sulfúrico. Depois do tratamento, de duração variável e dependente das sementes, estas devem ser neutralizadas em carbonato de sódio a 5%. Este tratamento é eficaz na quebra da dormência física.
- Estratificação a frio – Consiste na permanência, de duração variável, em ambiente húmido e frio, onde a temperatura pode variar entre 1º a 5ºC. As sementes podem ser colocadas sozinhas ou misturadas com areia. Pensa-se que este processo actua sobre o pH das células, originando alterações nas substâncias de reserva. O referido

tratamento possibilita a quebra de dormência fisiológica e morfofisiológica (Bacchetta *et al.*, 2008).

- Tratamentos térmicos ou com água – A sujeição das sementes a alternância de temperatura facilita o fendilhamento dos tegumentos. Permite também a eliminação de inibidores voláteis e certas barreiras à permeabilidade. Este tratamento é eficaz na quebra da dormência física (Bacchetta *et al.*, 2008).
- Aplicação de ácido giberélico - Apresenta um grande êxito na quebra de dormência fisiológica (Bacchetta *et al.*, 2008). Muitas vezes é necessário proceder a tratamentos de escarificação do tegumento das sementes, para facilitar a penetração (Bewley & Black, 1982).

2.6. OBJECTIVOS DO ESTUDO

Neste contexto, e tendo em consideração que o conhecimento do processo germinativo, desempenha uma função muito importante na conservação e propagação das espécies (Baskin & Baskin, 2001; Carolino, 1998), foi desenvolvido este trabalho no Banco de Sementes António Luís Belo Correia do Jardim Botânico de Lisboa - Museu Nacional de História Natural, que teve como principal objectivo seleccionar as condições óptimas para a germinação de sementes de dezasseis espécies, pertencentes a cinco famílias (Cistaceae, Malvaceae, Fabaceae, Scrophulariaceae e Umbelliferae) contribuindo desta forma para otimizar a monitorização da viabilidade das colecções de sementes de plantas autóctones conservadas em bancos de sementes.

Os objectivos específicos foram: i) seleccionar os tratamentos que maximizam a germinação e ii) seleccionar a temperatura óptima aplicando quatro regimes de temperatura de cada uma das espécies.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL UTILIZADO

A selecção das espécies para o nosso estudo foi feita entre as espécies autóctones do Banco de Sementes António Luís Belo Correia do Jardim Botânico de Lisboa - Museu Nacional de História Natural que aguardavam ensaio de germinação prévio ao armazenamento. Foram escolhidas 16 espécies, pertencentes a 5 famílias: *Adenocarpus complicatus* (L.) Gay; *Alcea rosea* L.; *Angelica pachycarpa* Lange; *Cytisus villosus* Pourr; *Elaeoselinum foetidum* (L.) Boiss; *Halimium lasianthum* (Lam.) Spach; *Lavatera arborea* L.; *Lavatera cretica* L.; *Margotia gummifera* (Desf.) Lange; *Scrophularia auriculata* Loefl. ex. L.; *Scrophularia scorodonia* L.; *Smyrniolum olusatrum* L.; *Tuberaria lignosa* (Sweet) Samp.; *Vicia sativa* L. subsp. *nigra* (L.) Ehrh; *Verbascum litigiosum* Samp. e *Verbascum virgatum* Vill.

O trabalho laboratorial decorreu nas instalações do Banco de Sementes António Luís Belo Correia do Jardim Botânico de Lisboa - Museu Nacional de História Natural, onde tivemos ao dispor o seguinte equipamento: sala de secagem, câmaras de germinação, câmara frigorífica; lupa electrónica; o material laboratorial: placas de *Petri* (9 cm Ø), papel de filtro (*Whatman* n.º 1), pinças, bisturi, lixas (P80 ou P40); os reagentes: água destilada. Foi também usado material gráfico.

3.2. CARACTERIZAÇÃO TAXONÓMICA E NOMENCLATURAL

Nas espécies do nosso estudo pertencentes às famílias Cistaceae, Fabaceae, Malvaceae, Scrophulariaceae, Umbelliferae, a nomenclatura utilizada teve por base a Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 1993; González *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 1999) e a *Plant List* (2010).

A informação, resultante da pesquisa, referente à fisionomia e ecologia (Franco, 1971) e designação comum (Rocha, 1996) apresenta-se no Quadro 6.

Quadro 6

Espécies estudadas, família, respectivo nome vulgar e tipo fisionómico, ciclo de vida, época de floração e dispersão da semente, tipo de fruto e dormência (Castroviejo *et al.*, 1993; Franco, 1971; González *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2003; Rocha, 1996; Talavera *et al.*, 1999).

Espécies	Família	Nomes vulgares	Tipo fisionómico	Ciclo de vida	Época de floração	Dispersão	Tipo de fruto	Tipo de dormência
<i>Halimium lasianthum</i> (Lam.) Spach	Cistaceae	Piloto	Nanofanerófito	Perene	Fev. – Jun.		Cápsula	Física
<i>Tuberaria lignosa</i> (Sweet) Samp.		Alcar	Terófito	Perene	Maio - Julho	Junho	Cápsula	Física
<i>Adenocarpus complicatus</i> (L.) Gay	Fabaceae	Codeço ; Rastreiro	Nano ou microfanerófito	Perene	Abril – Out.		Vagem	Física
<i>Cytisus villosus</i> Pourr			Nanofanerófito	Perene	Fev. - Maio		Vagem	Física
<i>Vicia sativa</i> L. subsp. <i>nigra</i> (L.) Ehrh		Ervilhaca miúda	Terófito	Anual	Março - Agosto		Vagem	Física
<i>Alcea rosea</i> L.	Malvaceae	Malva rosa	Nanofanerófito	Perene			Mericarpos	Física
<i>Lavatera arborea</i> L.		Malvaíscio	Hemicriptófito	Bienal ou perene	Março - Agosto		Mericarpos	Física
<i>Lavatera cretica</i> L.		Malva bastarda	Terófito	Anual / bienal	Março - Julho		Mericarpos	Física
<i>Scrophularia auriculata</i> Loefl. ex. L.	Scrophulariaceae	Erva das escaldadelas; Escrofulária nodosa	Caméfito	Perene		Julho	Cápsula	
<i>Scrophularia scorodonia</i> L.		Escrofulária; Erva-do-mau-olhado	Caméfito	Perene			Cápsula	

Quadro 6 (continuação)

Espécies estudadas, família, respectivo nome vulgar e tipo fisionómico, ciclo de vida, época de floração e dispersão da semente, tipo de fruto e dormência (Castroviejo *et al.*, 1993; Franco, 1971; González *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2003; Rocha, 1996; Talavera *et al.*, 1999).

Espécies	Família	Nomes vulgares	Tipo fisionómico	Ciclo de vida	Época de floração	Dispersão	Tipo de fruto	Tipo de dormência
<i>Verbascum litigiosum</i> Samp.		Verbasco de flores grossas	Hemicriptófito	Bienal			Cápsula	
<i>Verbascum virgatum</i> Vill.		Barbasco; Blatária-maior	Hemicriptófito	Bienal	Jun.- Set.		Cápsula	
<i>Angelica pachycarpa</i> Lange			Hemicriptófito	Perene	Jul. – Set.		Mericarpo	
<i>Elaeoselinum foetidum</i> (L.) Boiss		Rabaça-fedoenta	Hemicriptófito	Perene	Maio – Jun.	Jun – Jul.	Mericarpo	
<i>Margotia gummifera</i> (Desf.) Lange	Umbelliferae	Bruco-fétido	Hemicriptófito	Perene	Jun- Set.	Jul- Set.	Mericarpo	
<i>Smyrnum olusatrum</i> L.		Salsão; Salsa-do-cavalo	Hemicriptófito	Bienal	Jun- Agos.	Julho	Mericarpo	Morfofisiológica

3.3. ECOLOGIA HABITAT E DISTRIBUIÇÃO

Para que se possa determinar as condições ideais de germinação é muito importante conhecer a ecologia e habitat de cada espécie, de forma a integrar essa informação quando se definem os factores e requisitos necessários para a germinação de um registo. Neste contexto, apresentam-se no quadro 7, os habitats preferenciais de desenvolvimento das espécies.

Quadro 7

Habitats das espécies em estudo (Castroviejo *et al.*, 1993; González *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 1999).

Espécies	Famílias	Ecologia e habitat	Tipo de distribuição ¹
<i>Halimium lasianthum</i>	Cistaceae	Em climas de influência atlântica, em solo pobre, medianamente húmido e arenoso. Tojais e estevais.	AAI; Ag; BA; BB; BL e E.
<i>Tuberaria lignosa</i>		Pastagens, moitas e bosques pouco densos, ricos em terófitos sobre solo ácido.	AAI; Ag; BA; BB; BL; DL e E.
<i>Adenocarpus complicatus</i>	Fabaceae	Terrenos desflorestados e baldios de influência continental, solos pobres em bases preferencialmente silícios. 100-1500m.	AAI; BB; BL e TM.
<i>Cytisus villosus</i>		Solos florestais: carvalhais, azinheirais, sobreirais, maduros, silícios ou descarbonatados. 0-1000 m	Sul e Noroeste da Península Ibérica
<i>Vicia sativa subsp. nigra</i>		Pastagens, herbados, e campos de cultivo. 0-2000 m	AAI; Ag; BA; BA; BB; BL; DL; E; M; R e TM.
<i>Alcea rosea</i>	Malvaceae	Litoral, 0-100m.	AAI; Ag e BB.
<i>Lavatera arborea</i>		Rochas ou areias do litoral, bordaduras de caminhos e hortas. 0-600m.	AAI; Ag; BA; BA; BB; BL; DL; E; M; R e TM.
<i>Lavatera cretica</i>		Areias e rochedos junto ao mar, margens de caminhos, campos cultivados. 0-800m.	Ag; AAI; BA; BA; BL; DL; E; M e TM.

1) AI-Alto Alentejo; Ag-Algarve; BA-Baixo Alentejo; BB-Beira Baixa; BL-Beira Litoral; E-Estremadura; DL-Douro Litoral; TM-Trás-os-Montes; M-Minho; R-Ribatejo

Quadro 7 (continuação)

Habitats das espécies em estudo (Castroviejo *et al.*, 1993; González *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 1999).

Espécies	Famílias	Ecologia e habitat	Tipo de distribuição ¹
<i>S. auriculata</i>		Relvados húmidos e ripícola.	AAI; Ag; BA; BB; BL (DL); E; M; R e TM.
<i>S. scorodonia</i>		Relvados húmidos e ruderal.	AAI; Ag; BA; BB; BL (DL); E; M; R e TM.
<i>Verbascum litigiosum</i>	Scrophulariaceae	Areais marítimos. 5-20m.	Ag; E e BL
<i>Verbascum virgatum</i>		Terrenos baldios, em solos arenosos e substratos ácidos e húmidos. 200-1400m.	AAI; Ag; BA; BB; BL; DL; E; M; R e TM.
<i>Angelica pachycarpa</i>		Escarpas e zonas sob a influência do mar. 0-90m.	E.
<i>Elaeoselinum foetidum</i>		Pinhais, sobreirais, matos degradados, substratos ácidos. 0-600m.	AAI; Ag; BA e E
<i>Margotia gummiifera</i>	Umbelliferae	Matos degradados, de preferência solos ácidos. 0- 1000m.	AAI; Ag; BA; BA; BL; DL; E; M e TM
<i>Smyrniolum olusatrum</i>		Sítios sombrios e húmidos. Planta nitrófila.	E; Ag e DL

1) AI-Alto Alentejo; Ag-Algarve; BA-Baixo Alentejo; BB-Beira Baixa; BL-Beira Litoral; E-Estremadura; DL-Douro Litoral; TM-Trás-os-Montes; M-Minho; R-Ribatejo

3.4. LOCAL DE COLHEITA E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Inicialmente foi feita uma selecção das espécies entre os registos de espécies autóctones do Banco de Sementes que aguardavam ensaio de germinação prévio ao armazenamento a -18°C. Os critérios de selecção tiveram em conta o número de sementes necessário à realização das experiências. As espécies foram seleccionadas em cinco famílias, com 3-4 espécies por família, num total de 16 espécies (Quadro 8).

As sementes haviam sido secas, ficando com cerca de 15% Humidade Relativa, à temperatura de 15°C, e mantidas na sala de secagem, em tubos de ensaio fechados com algodão até à sua utilização nos testes de germinação.

Quadro 8
Espécies seleccionadas, local e data de colheita dos diásporos, com respectivo número de registo no BS A.L. Belo Correia.

Espécies	Famílias	Registo	Local de colheita	Data de colheita
<i>Halimium lasianthum</i>	Cistaceae	BG.MNHN.UL 004930	Sesimbra	02-05-1997
<i>Tuberaria lignosa</i>		BG.MNHN.UL 004943	Loures (Montachique)	05-06-1995
<i>Adenocarpus complicatus</i>	Fabaceae	BG.MNHN.UL 006134	Abrantes (Pego)	06-08-1994
<i>Cytisus villosus</i>		BG.MNHN.UL 006209	Jardim Botânico (MNHN)	13-07-1993
<i>Vicia sativa subsp. nigra</i>		BG.MNHN.UL 006477	Sesimbra (Zambujal)	03-06-1995
<i>Alcea rosea</i>		BG.MNHN.UL 006534	Monchique	11-07-2000
<i>Lavatera arborea</i>	Malvaceae	BG.MNHN.UL 006558	Arquipélago das Berlengas (Farilhão Grande)	03-07-2000
<i>Lavatera cretica</i>		BG.MNHN.UL 006564	Serra da Arrábida	08-06-2000
<i>S. auriculata</i>		BG.MNHN.UL 007496	Sintra (Pedra Furada)	08-06-2000
<i>S. scorodonia</i>	Scrophulariaceae	BG.MNHN.UL 007522	Sintra (Pedra Furada)	07-07-1998
<i>V. litigiosum</i>		BG.MNHN.UL 007525	Sintra (Praia das Maças)	06-07-1995
<i>V. virgatum</i>		BG.MNHN.UL 007543	Abrantes	09-08-1994
<i>Angelica pachycarpa</i>		BG.MNHN.UL 007670	Arquipélago das Berlengas (Farilhão Grande)	03-05-2000
<i>Elaeoselinum foetidum</i>	Umbelliferae	BG.MNHN.UL 0027	Mértola	05-07-1998
<i>Margotia gummifera</i>		BG.MNHN.UL 007783	Faro (Ludo)	03-07-1999
<i>Smyrniolum olusatrum</i>		BG.MNHN.UL 00807	Cascais	10-05-1995

3.5. PREPARAÇÃO DAS SEMENTES

Algumas das sementes tiveram que ser sujeitas a um novo processo de limpeza e individualização dos mericarpos nas famílias Malvaceae (*Alcea rosea*, *Lavatera arborea* e *Lavatera cretica*) e Umbellifereae (*Margotia gumifera* e *Smyrniolum olusatrum*).

Neste processo foram utilizadas pinças, bisturi e lupa. Depois de limpas e separadas, as sementes foram colocadas em placas de *Petri*, devidamente identificadas.

Procedeu-se também à elaboração de um pequeno sementário, para possibilitar a identificação das sementes de forma mais prática (Figura 6).

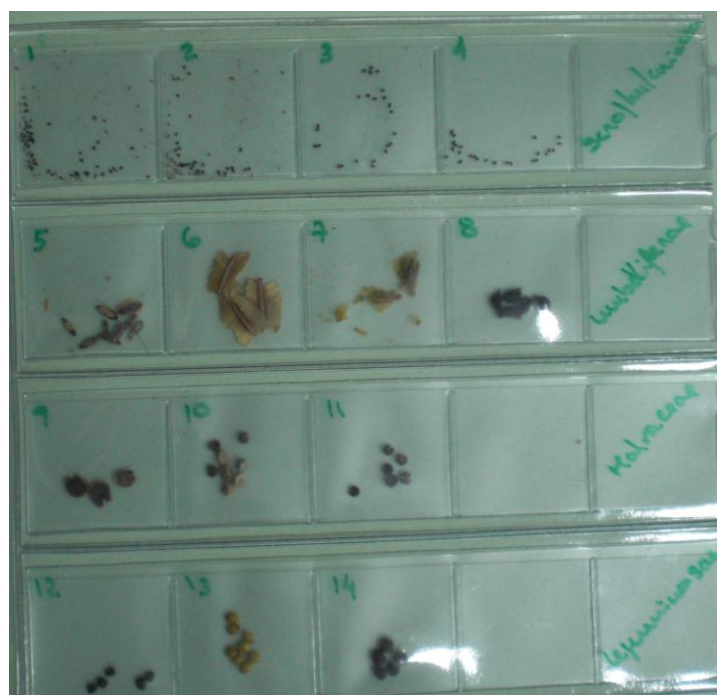


Figura 6
Sementário.

Posteriormente, as sementes foram fotografadas, recorrendo-se a máquina fotográfica digital com lupa associada. Algumas das suas imagens estão representadas na Figura 7.

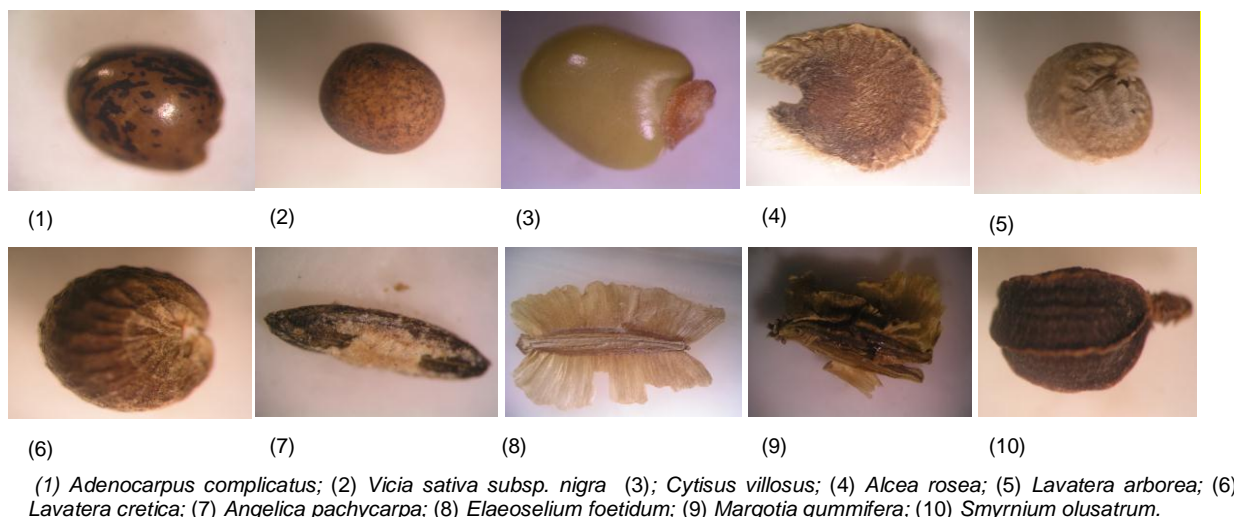


Figura 7
Fotografias das sementes das plantas autóctones.

Para a realização dos testes de germinação, seria necessário um número total de 800 sementes por espécie, resultando dos seguintes cálculos: 2 Tratamentos x 4 Temperaturas x 4 Réplicas x 25 Sementes/Réplica (v. desenho experimental).

Dado que o lote de sementes das espécies *Alcea rosea*, *Lavatera arborea* e *Lavatera cretica* era reduzido, foi necessário proceder ao cálculo por estimativa da quantidade de sementes existentes, para podermos definir o número de sementes por réplica e o número de réplicas.

Em relação a cada espécie foi pesada a amostra total na balança digital, previamente tarada, decidindo-se registar a pesagem até três casas decimais. Procedeu-se depois à pesagem de 50 sementes. Assim, por estimativa conseguimos obter o número possível de sementes total de cada lote, como se pode observar no Quadro 9.

Quadro 9
N.º de sementes estimado por lote de sementes.

Espécie	Amostra total (g)	50 sementes (g)	N.º de sementes estimado por lote
<i>Alcea rosea</i>	7,537	0,582	647
<i>Lavatera arborea</i>	8,558	0,486	930
<i>Lavatera cretica</i>	6,811	0,430	841

Em virtude do lote de sementes das espécies *Adenocarpus complicatus*, *Cytisus villosus*, *Elaeoselinum foetidum*, *Halimium lasianthum*, *Margotia gummifera*, *Tuberaria lignosa* e *Vicia*

sativa subsp. nigra ser diminuto, foi realizada a contagem manual das respectivas sementes, tendo sido obtidos os dados referenciados no Quadro 10.

Quadro 10
N.º de sementes por amostra total.

Espécie	Amostra total (nº de sementes)
<i>Adenocarpus complicatus</i>	168
<i>Cytisus villosus</i>	166
<i>Elaeoselinum foetidum</i>	209
<i>Halimium lasianthum</i>	210
<i>Margotia gummifera</i>	245
<i>Tuberaria lignosa</i>	204
<i>Vicia sativa subsp. nigra</i>	322

3.6. DESENHO EXPERIMENTAL

A experiência foi realizada para cada espécie em desenho factorial completo de dois factores: pré-tratamento e temperatura. O factor pré-tratamento foi testado em dois níveis (controlo e um pré-tratamento definido abaixo para cada família) e o factor temperatura em quatro níveis (15°C; 20°C; 25°C e 25º/15°C-temperatura alternada dia/noite). Foram usadas 4 réplicas de 25 sementes em cada nível. Devido ao reduzido número de sementes disponível, não foi possível incluir todos os tratamentos ou foi necessário reduzir o número de sementes por réplica ou réplicas para algumas espécies (Quadro 11).

Quadro 11

Síntese do pré-tratamento utilizado, temperaturas de germinação, número de réplicas e quantidade de sementes por réplica para as espécies estudadas.

Espécies	Pré-tratamentos	Temperaturas de germinação				Nº de réplicas	Nº de sementes/ réplica
		15º	20º	25º	15º/25º		
<i>Halimium lasianthum</i>	Escarificação térmica	x	✓	x	✓	4	25
<i>Tuberaria lignosa</i>		x	✓	x	✓	4	25
<i>Adenocarpus complicatus</i>	Escarificação mecânica	✓	✓	x	✓	4	20
<i>Cytisus villosus</i>		✓	✓	x	x	4	20
<i>Vicia sativa subsp. nigra</i>		✓	✓	✓	✓	4	20
<i>Alcea rosea</i>		✓	✓	x	✓	4	25
<i>Lavatera arborea</i>		✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Lavatera cretica</i>		✓	✓	✓	✓	4	25

✓ Realizado; x Não realizado

Quadro 11

Síntese do pré-tratamento utilizado, temperaturas de germinação, número de réplicas e quantidade de sementes por réplica para as espécies estudadas. (continuação).

Espécies	Pré-tratamentos	Temperaturas de germinação				Nº de réplicas	Nº de sementes/réplica
<i>Scrophularia auriculata</i>	Estratificação a frio	✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Scrophularia scorodonia</i>		✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Verbascum litigiosum</i>		✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Verbascum virgatum</i>		✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Angelica pachycarpa</i>		✓	✓	✓	✓	4	25
<i>Elaeoselinum foetidum</i>		✓	✓	✓	✓	3	17
<i>Margotia gummifera</i>		✓	✓	✓	✓	3	20
<i>Smyrniolum olusatrum</i>		✓	✓	✓	✓	4	25

✓Realizado; ✗Não realizado

3.7. PRÉ-TRATAMENTOS

Para testar o efeito de pré-tratamentos na germinação foram aplicados três tipos de tratamentos com o objectivo de quebrar a dormência da semente, definidos para as diferentes famílias (Eastwood, 2009; Galmés *et. al.*, 2006; ISTA, 2006; Rahnema-Ghahfarokhi & Tavakkol-Afshari, 2007; Walsh *et. al.*, 2003), tal como descrevemos seguidamente:

- As espécies da família Cistaceae foram sujeitas a escarificação térmica, com exposição das sementes a 115°C, durante 10 minutos em estufa;
- As espécies da família Fabaceae e Malvaceae, sofreram processos de escarificação mecânica, onde o tegumento das sementes foi sujeito a abrasão com lixa. Foram realizados testes para que a granulometria das lixas, a força imprimida e o número de movimentos vai-vem, fossem os mais ajustados às sementes em estudo. Todas as sementes foram posteriormente avaliadas à lupa para se verificar a homogeneidade da operação de escarificação e excluir possíveis sementes deterioradas. No caso da espécie *Alcea rosea* fez-se um pequeno corte e remoção do tegumento com bisturi. A escarificação foi realizada no primeiro dia do início do ensaio.

- As espécies da família Umbelliferae e da família Scrophulariaceae foram sujeitas a um processo de estratificação a frio, tendo sido as suas sementes colocadas numa câmara frigorífica a 4°C, durante 30 dias, antes de iniciar os testes de germinação.
- Controlo – onde não foi aplicado qualquer tratamento às sementes.

Posteriormente aos pré-tratamentos de germinação efectuados, procedeu-se à preparação das placas de *Petri*, onde foi colocado papel de filtro, humedecido em água destilada até à sua saturação, usando o método TP (*Top of Paper*), ou seja as sementes foram distribuídas uniformemente sobre o papel de filtro.

As placas de *Petri* foram colocadas em câmaras de germinação (Fitoclima Aralab, S600 PLH), nos quatro regimes de temperatura: 15°C; 20°C; 25°C e 15°/25°C e um fotoperíodo de 8 horas de luz/16 horas de escuro (Figura 8).

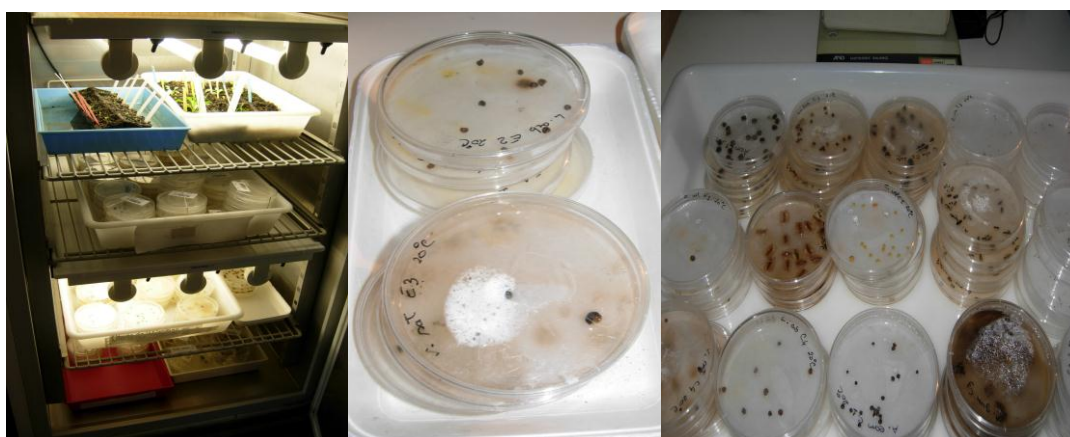


Figura 8
Câmara de germinação com as placas de *Petri*, durante o ensaio e pormenores das mesmas.

A germinação das sementes foi definida como a emergência da radícula (Villamil & Laborde, 2001) Foi considerado que uma semente intacta havia germinado, quando a radícula eclodia dos invólucros seminais (Caixinhas, 1988).

As sementes germinadas foram contadas à lupa, a cada 2-3 dias e retiradas das placas de *Petri*. A sua posição era mudada de 3-4 dias com o objectivo de uniformizar as condições físicas de germinação.

Ao longo da experiência, o papel de filtro foi humedecido com água destilada sempre que necessário.

Todas as sementes contaminadas por fungos foram limpas com hipoclorito de sódio (a 5%).

Todos os testes tiveram uma duração de 30 dias. Findo este período, as sementes não germinadas foram sujeitas a um *cut-test*, sendo cortadas e abertas com bisturi e depois observadas à lupa electrónica, com o objectivo de avaliar a sua viabilidade. As sementes foram assim classificadas em viáveis e inviáveis. As sementes viáveis caracterizaram-se por apresentarem embrião e endosperma com aspecto são, e as inviáveis por apresentarem embrião e endosperma enegrecido ou deteriorado ou sementes vazias (sem embrião), de acordo com Gosling (2003).

3.8. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

As sementes germinadas foram contadas e o valor da percentagem de germinação acumuladas ao longo dos dias, é apresentada sob a forma de curvas de germinação.

Os resultados foram expressos em:

Germinação máxima (Bacchetta *et al.*, 2008): são calculadas as percentagens de germinação para cada réplica, segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n.º de sementes germinadas}}{\text{n.º total de sementes} - \text{n.º de sementes vazias}} \times 100$$

A percentagem final do ensaio é calculada com base na média obtida entre todas as réplicas sujeitas a iguais condições de germinação.

T50 – Velocidade de germinação (Côme, 1970): Corresponde ao tempo necessário para obter 50% da capacidade germinativa do lote e mede-se em dias.

T10-90 - Duração do período de germinação (Baskin & Baskin, 2001): tempo que decorre entre o momento em que se atinge 10% da germinação máxima e o momento em que se atinge 90% da germinação máxima e mede-se em dias.

Realçamos que neste trabalho, para os valores de percentagem de germinação iguais ou inferiores a 5% não foram calculados o T50 e o T10-90.

O efeito do tratamento e da temperatura na germinação máxima e no T50 e T10-90 foi testado para cada espécie usando uma ANOVA de dois factores (Pestana & Gageiro, 2000; Tuckman, 2005). Utilizou-se como referência para aceitar ou rejeitar a hipótese nula, um nível de significância $p < 0,05$.

Neste caso, quando encontradas diferenças significativas, utilizou-se o teste de comparação múltipla a posteriori de *Tukey (post-hoc)*, para determinar as diferenças entre temperaturas e tratamentos tendo em conta a média dos parâmetros ($p < 0,05$) (Galmés *et. al.*, 2006). Foram realizados previamente testes de homogeneidade de variâncias (*Cochran*), e testes de normalidade e, nos casos em que os pressupostos de distribuição normal e de homogeneidade de variâncias não se verificaram, os dados foram transformados usando a transformação arcseno (percentagem de germinação máxima) ou logaritmo (T50 e T10-90).

Quando foram avaliadas as interacções entre a temperatura e o tratamento, utilizou-se a ANOVA de um factor ou teste *t* de *Student*. Nos casos em que a germinação foi muito baixa para um dos tratamentos (controlo ou pré-tratamento), foi testado apenas o efeito da temperatura no T50 e/ou T10-90 do controlo ou pré-tratamento recorrendo a ANOVA de um factor ou teste *t* de *Student*.

Todos os procedimentos estatísticos, relativos ao tratamento dos dados recolhidos, foram efectuados com recurso às facilidades de processamento do programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc.).

4. RESULTADOS

Família – Cistaceae

O tratamento teve efeito significativo na Germinação Máxima apenas em *T. lignosa*, enquanto a temperatura não teve efeito significativo na germinação de nenhuma das espécies (Quadro 12). Em *T. lignosa* o controlo apresentou um valor muito inferior à escarificação (1 e 18,5%, respectivamente, Figura 9).

Quadro 12

Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação térmica e controlo) e temperatura (20°C e 15/25°C) na percentagem de germinação máxima de *H. lasianthum* e *T. lignosa*, incubadas 30 dias em condições controladas.

Espécie	<i>Halimium lasianthum</i>		<i>Tuberaria lignosa</i>	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratam.	2,00	0,183 ns	55,07	0,000***
Temp.	0,59	0,456 ns	2,24	0,160 ns
Tratam.*Temp.	1,38	0,264 ns	2,24	0,160 ns

*** $p < 0,001$; ns – não significativo

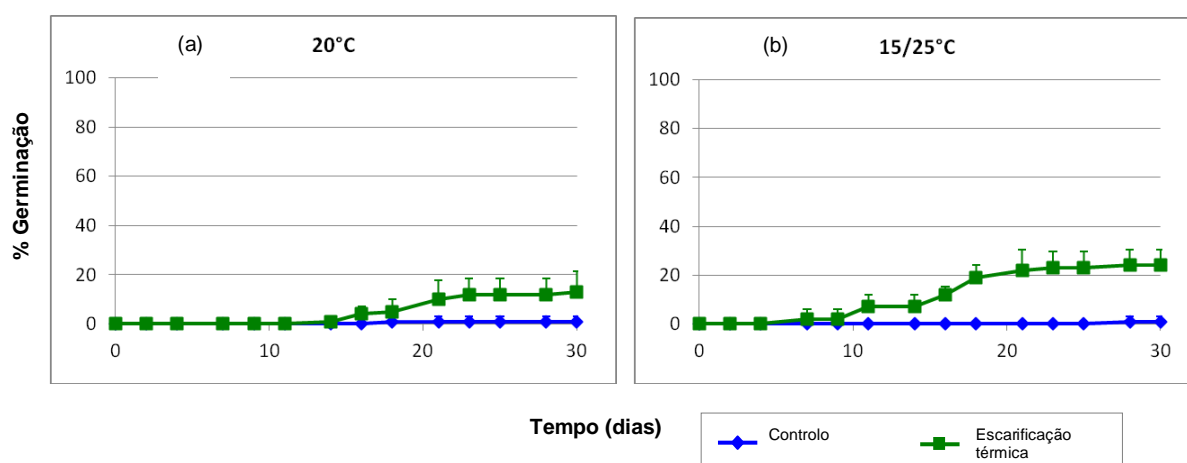


Figura 9

Curvas de germinação de sementes de *T. lignosa*, sujeitas a escarificação térmica e controlo em (a) regime de temperatura constante 20°C e em (b) regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

Em *H. lasianthum* o controlo apresentou um valor muito inferior à escarificação, embora essa diferença não seja significativa. (Figura 10).

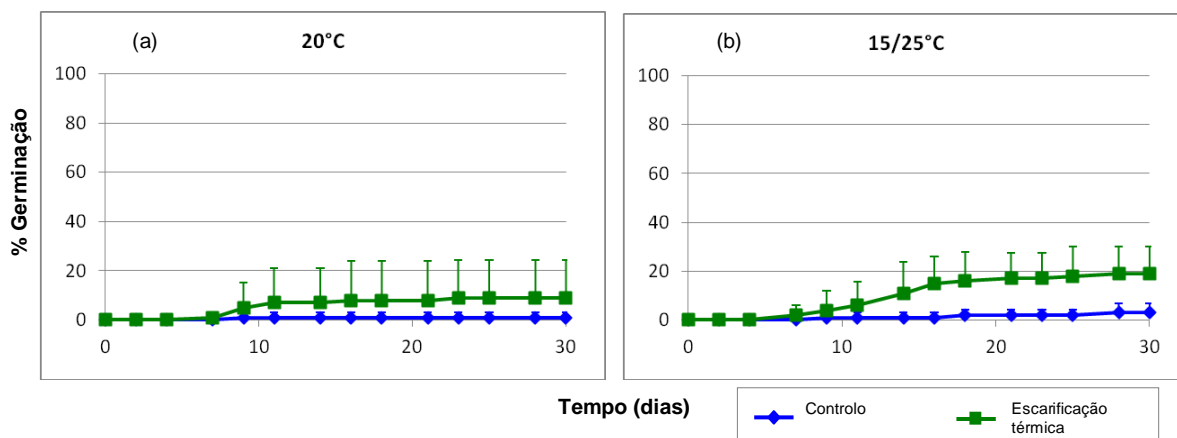


Figura 10

Curvas de germinação de sementes de *H. lasianthum*, sujeitas a escarificação térmica e controlo em (a) regime de temperatura constante 20°C e em (b) regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

A temperatura teve efeito significativo na velocidade de germinação (T50) das sementes escarificadas apenas em *T. lignosa* (Quadro 13), com valor superior a 20°C (21 dias) e inferior a 15°/25°C (13 dias) (Figura 11). Não se registaram efeitos significativos da temperatura no T50 para o *H. lasianthum* (Figura 12).

Não se registaram efeitos significativos da temperatura na duração do período de germinação (T10-90) das sementes em nenhuma das espécies (Quadro 13, Figura 13 e 14).

Quadro 13

Resultados do teste *t* para os efeitos da temperatura no T50 e T10-90 de sementes escarificadas de *H. lasianthum* e *T. lignosa*, incubadas 30 dias em condições controladas em duas temperaturas.

Espécie	<i>H. lasianthum</i>		<i>T. lignosa</i>	
	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
T50	1,44	0,199 ns	3,93	0,008**
T10-90	0,36	0,729 ns	0,05	0,964 ns

***p*<0,01; ns – não significativo

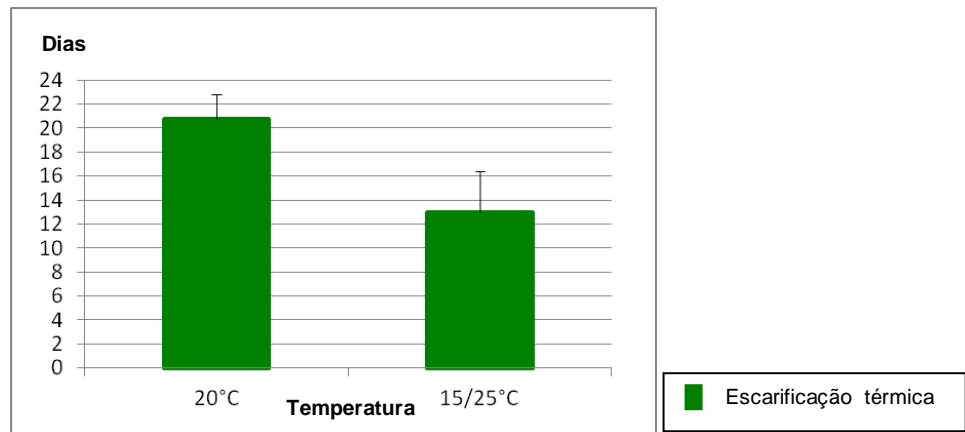


Figura 11

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *T. lignosa*, sujeitas a escarificação térmica, em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

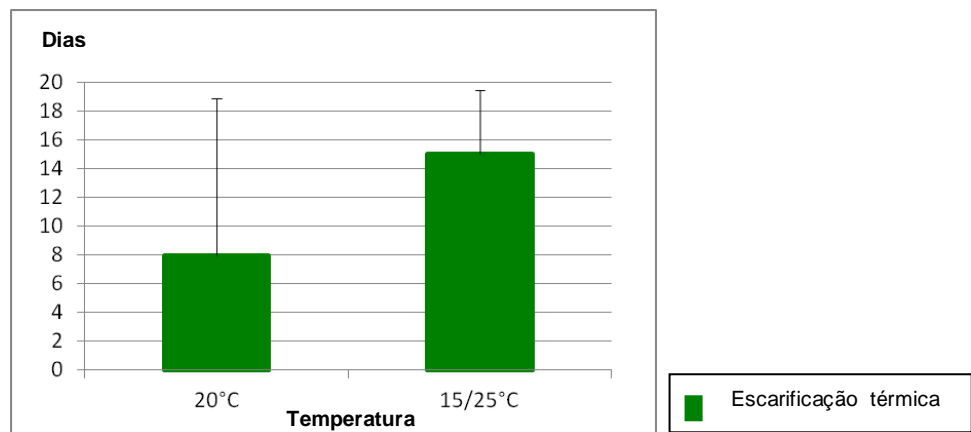


Figura 12

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *H. lasianthum*, sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

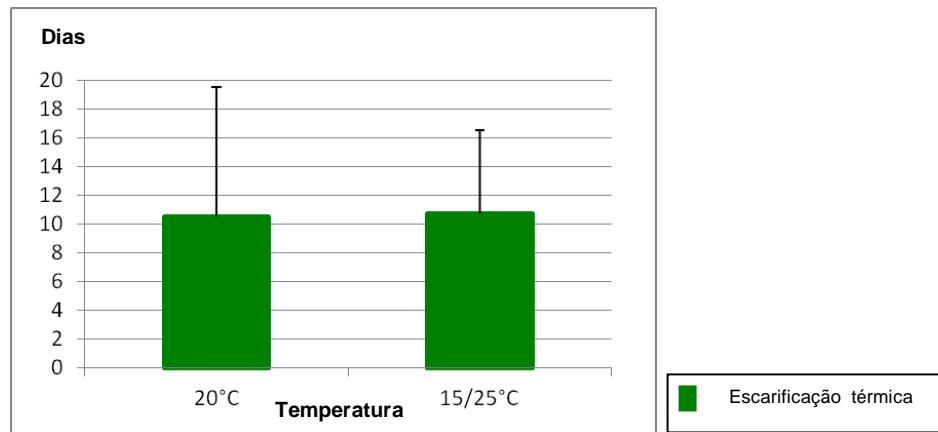


Figura 13

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *T. lignosa*, sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

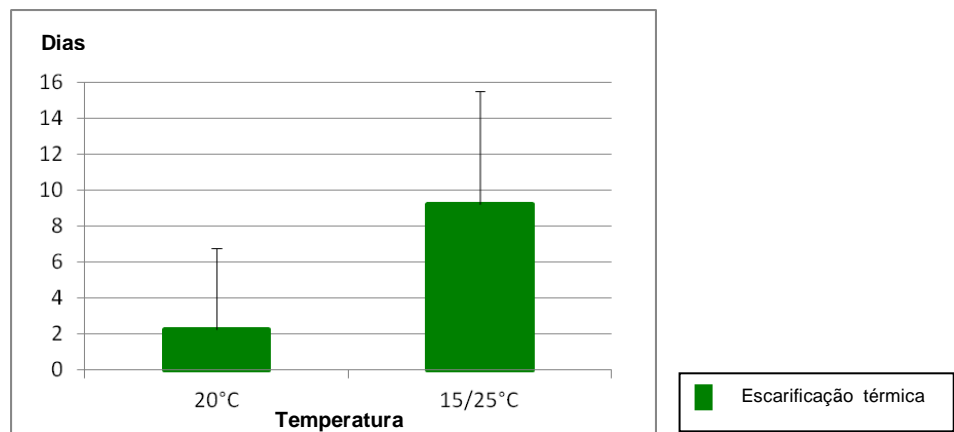


Figura 14

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *H. lasianthum*, sujeitas a escarificação térmica em regime de temperatura constante 20°C e regime de alternância 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

Família – Fabaceae

O tratamento de escarificação teve um efeito significativo na Germinação Máxima de *A. complicatus* e *C. villosus*, com valores médios de 90,4% e 75,7%, respectivamente (Quadro 14, Figura 15 e 16). O mesmo não se verificou para a *V. sativa* subsp. *nigra* (Figura 17).

Quadro 14

Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controle) e temperatura na percentagem de germinação máxima de *A. complicatus* (15°C, 20°C e 15/25°C), *C. villosus* (15°C e 20°C) e *V. sativa* subsp. *nigra* (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C), incubadas 30 dias em condições controladas.

Espécie	<i>A. complicatus</i>		<i>C. villosus</i>		<i>Vicia sativa</i> subsp. <i>nigra</i>	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratam.	1807,74	0,000***	31,15	0,000***	1,82	0,190 ns
Temp.	1,70	0,211 ns	0,61	0,450 ns	4,14	0,017*
Tratam.*Temp.	1,22	0,317 ns	4,82	0,049*	2,73	0,066 ns

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns – não significativo

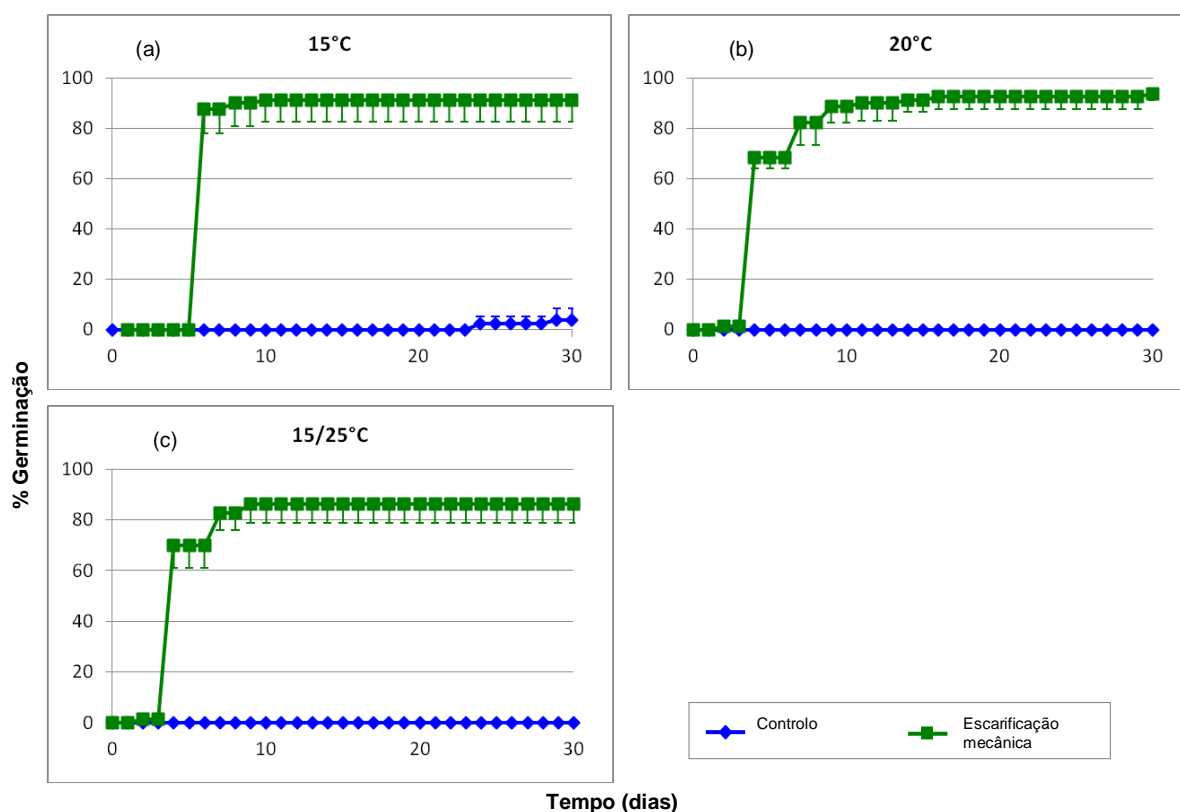


Figura 15

Curvas de germinação de sementes de *A. complicatus*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C, em (b) regime de temperatura constante 20°C e em (c) regime de alternância 15/25°C, com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

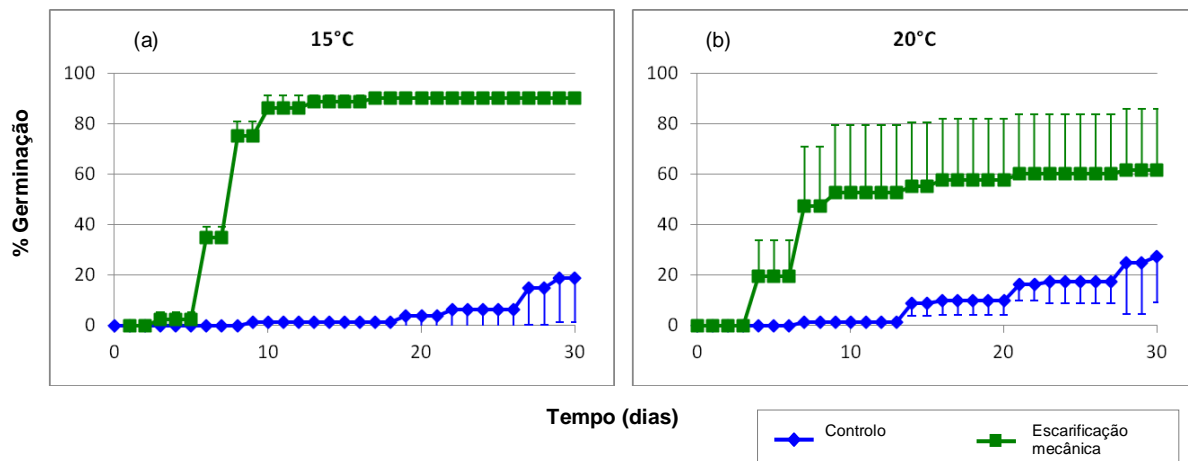


Figura 16

Curvas de germinação de sementes de *C. villosus*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C e em (b) regime de temperatura constante 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

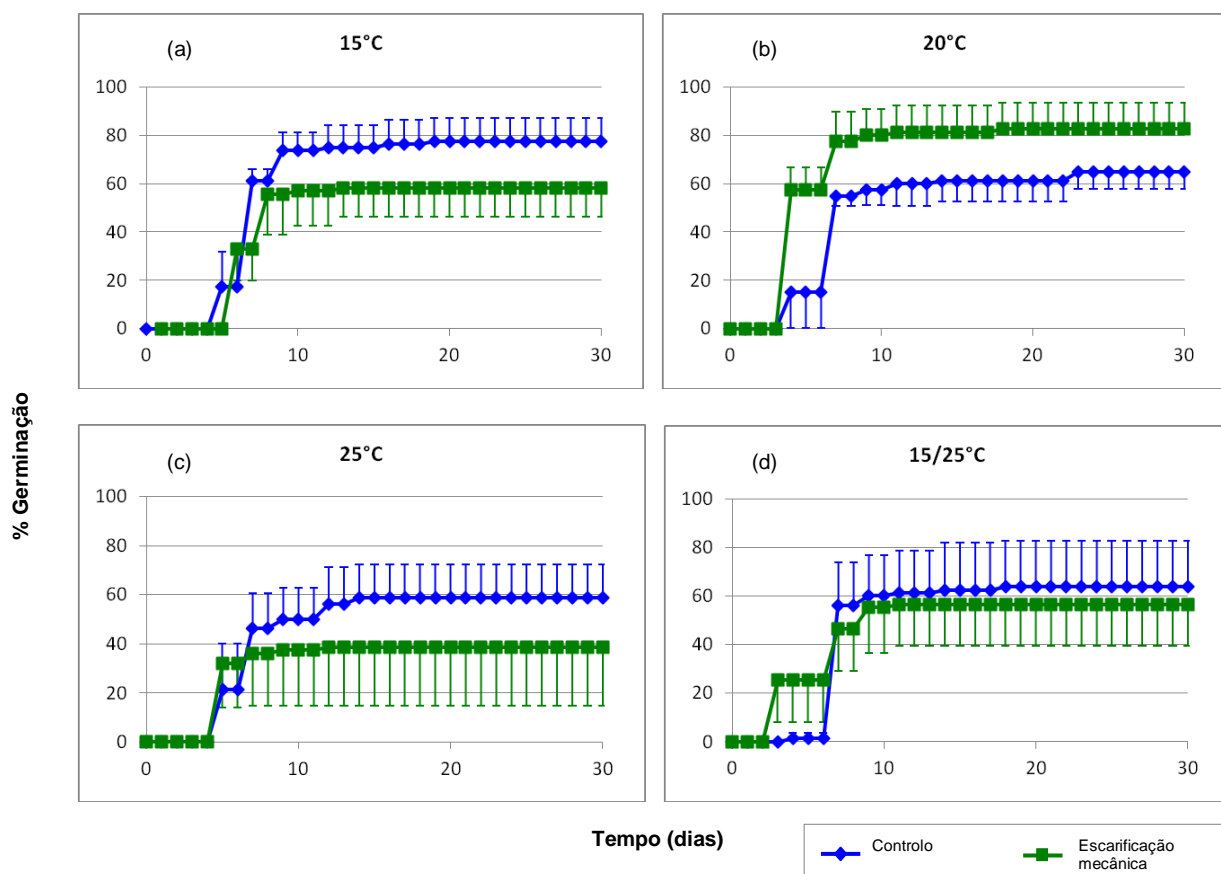


Figura 17

Curvas de germinação de sementes de *V. sativa* subsp. *nigra*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

A temperatura teve um efeito significativo na Germinação Máxima apenas em *V. sativa* subsp. *nigra* (Quadro 14), com valores superiores a 15°C e 20°C (valores médios de 67,9% e 73,9%, respectivamente, Figura 17).

Em *C. villosus* registou-se ainda uma interação significativa entre o tratamento e a temperatura (Quadro 14), com germinação máxima no tratamento escarificação significativamente superior ao controlo a 15°C mas apenas marginalmente superior, sem diferenças significativas, a 20°C (Quadro 15).

Quadro 15

Resultados do teste *t* os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) na percentagem de germinação máxima de sementes de *C. villosus* incubadas 30 dias em condições controladas em duas temperaturas (15°C e 20°C).

Temperaturas (°C)		
	<i>t</i>	<i>p</i>
15°	5,873	0,001***
20°	2,259	0,065 ns

****p*<0,001; ns – não significativo

O tratamento teve um efeito significativo no T50 de *C. villosus* e *Vicia sativa* subsp. *nigra* (Quadro 16). Os valores de T50 foram superiores no controlo para ambas as espécies (18 e 6 dias, 7 e 5 dias, para o controlo e escarificação em *C. villosus* e *Vicia sativa* subsp. *nigra*, respectivamente (Figura 18 e Figura 19).

Quadro 16

Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura na velocidade de germinação (T50) e duração do período de germinação (T10-90) de *A. complicatus*, *C. villosus* e *V. sativa* subsp. *nigra*, incubadas 30 dias em condições controladas.

Espécie	<i>A. complicatus</i>				<i>C. villosus</i>				<i>V. sativa subsp. nigra</i>			
	T10-90		T50		T10-90		T50		T10-90			
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>		
Tratam.	-	-	14,06	0,003 **	2,75	0,123 ns	27,00	0,000***	3,49	0,074 ns		
Temp.	7,62	0,011*	0,10	0,755 ns	5,87	0,032*	1,40	0,267 ns	0,63	0,603 ns		
Tratam.*Temp.	-	-	0,31	0,587 ns	0,52	0,484 ns	3,00	0,050 ns	5,19	0,007 **		

p*<0,05; *p*<0,01; ****p*<0,001; ns – não significativo

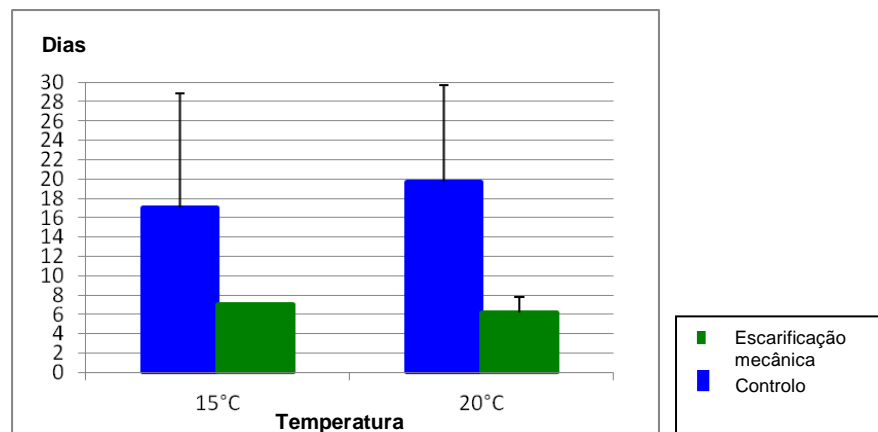


Figura 18

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *C. villosus*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

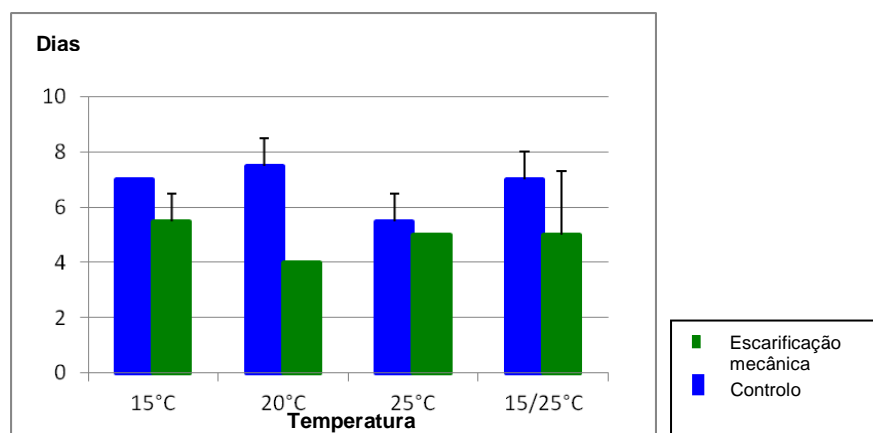


Figura 19

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *V. sativa* L. subsp. nigra, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

A temperatura não teve efeitos significativos no T50 em ambas as espécies (Quadro 16). Em *A. complicatus* não foram calculados os valores de T50 para o controlo devido à percentagem de germinação muito reduzida. Nas sementes com escarificação, o T50 não registou variação entre as temperaturas, não tendo sido efectuado nenhum teste estatístico devido à ausência de variância (Figura 20).

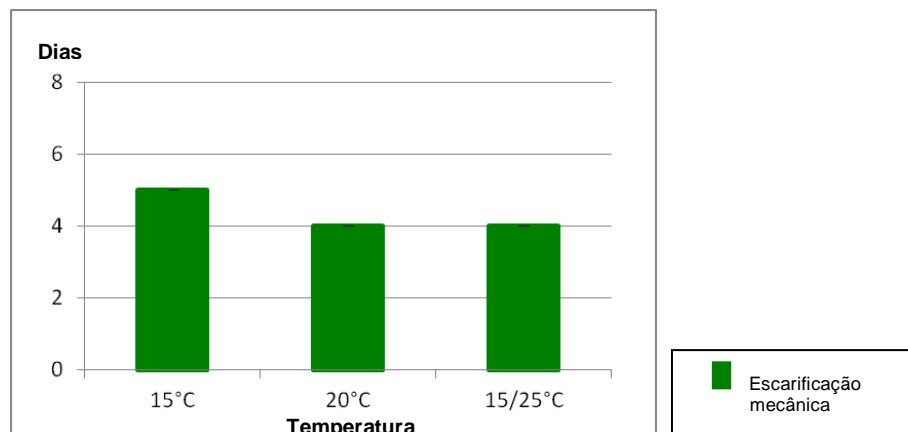


Figura 20

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *A. complicatus*, sujeitas a escarificação mecânica em diferentes regimes de temperatura, com fotoperíodo de 8 h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

O tratamento não teve efeito significativo na duração da germinação (T10-90) de *C. villosus*, enquanto a temperatura teve efeitos neste parâmetro, com valores superiores a 20°C e inferiores a 15°C (13 dias e 6 dias, respectivamente, Quadro 16, Figura 21).

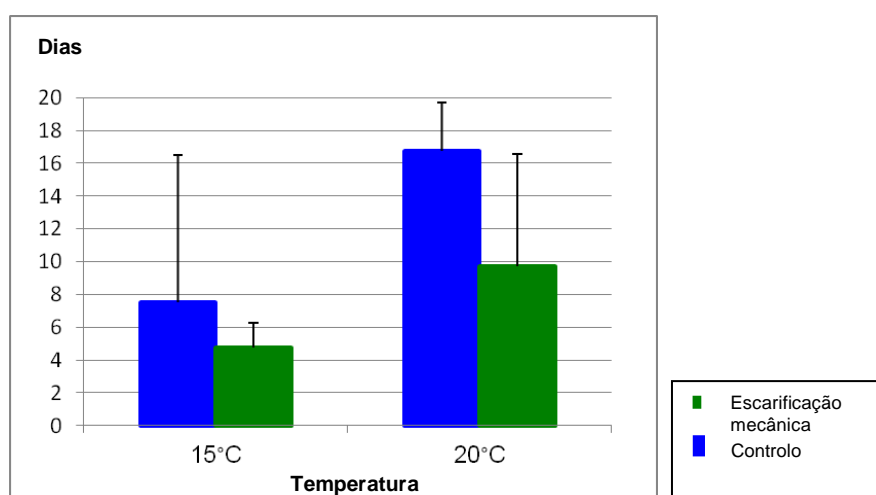


Figura 21

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *C. villosus*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

Em *Vicia* verificou-se uma interação significativa entre o tratamento e a temperatura para o T10-90, com diferenças significativas entre o controle e a escarificação apenas para duas temperaturas (25°C e 15/25°C) (Quadro 17). O T10-90 foi superior no controle a 25°C, enquanto a 15/25°C foi superior na escarificação (Figura 22).

Quadro 17

Resultados do teste *t* para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controle) na duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *Vicia sativa* subsp. *nigra* incubadas 30 dias em condições controladas em quatro temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C).

Temperaturas (°C)		
	<i>t</i>	<i>p</i>
15°	1,083	0,320 ns
20°	1,773	0,126 ns
25°	3,050	0,022*
15/25°	5,370	0,001***

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns – não significativo

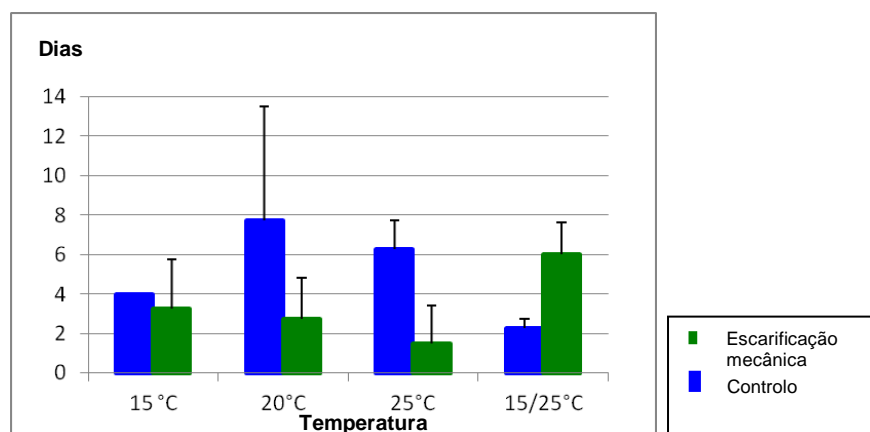


Figura 22

Velocidade de germinação (T10-90) de sementes de *V. sativa* subsp. *nigra*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

Em *A. complicatus* a temperatura teve efeito significativo no T10-90 das sementes com escarificação, com valores superiores a 20°C (Quadro 16, Figura 23).

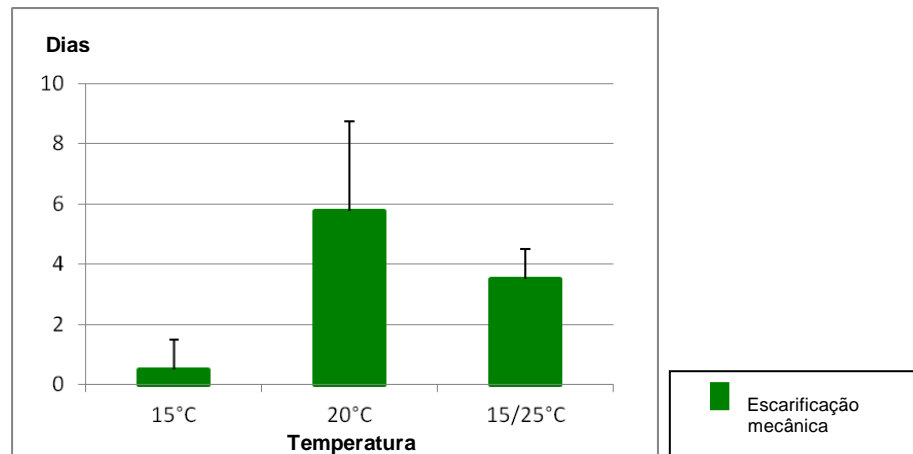


Figura 23

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *A. complicatus*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C, 20°C e regime de alternância 15/25°C, com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 20 sementes.

Família – Malvaceae

As três espécies testadas apresentaram padrões distintos de germinação, com uma percentagem de germinação média de 58% em *L. arborea* e apenas 1 e 9% em *A. rosea* e *L. cretica*, respectivamente.

O tratamento teve um efeito significativo na Germinação Máxima das três espécies testadas, enquanto a temperatura teve efeitos significativos apenas numa das espécies (*L. arborea*) (Quadro 18).

Quadro 18

Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C) para todas as espécies excepto para a *A. rosea* (15°C, 20°C e 15/25°C) na percentagem de germinação máxima de *A. rosea*, *L. arborea* e *L. cretica*, incubadas 30 dias em condições controladas.

Espécie	<i>A. rosea</i>		<i>L. arborea</i>		<i>L. cretica</i>	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratam.	10,33	0,005**	9,48	0,005**	14,00	0,001***
Temp.	0,980	0,394 ns	6,34	0,003**	2,35	0,098 ns
Tratam.*Temp.	0,980	0,394 ns	7,42	0,001***	3,39	0,035*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns – não significativo

Em duas espécies (*L. arborea* e *L. cretica*) registou-se ainda uma interacção significativa entre o tratamento e a temperatura (Quadro 18). Em *A. rosea*, não se registou germinação no controlo e a Germinação Máxima foi muito baixa com escarificação (2,7%, Figura 24).

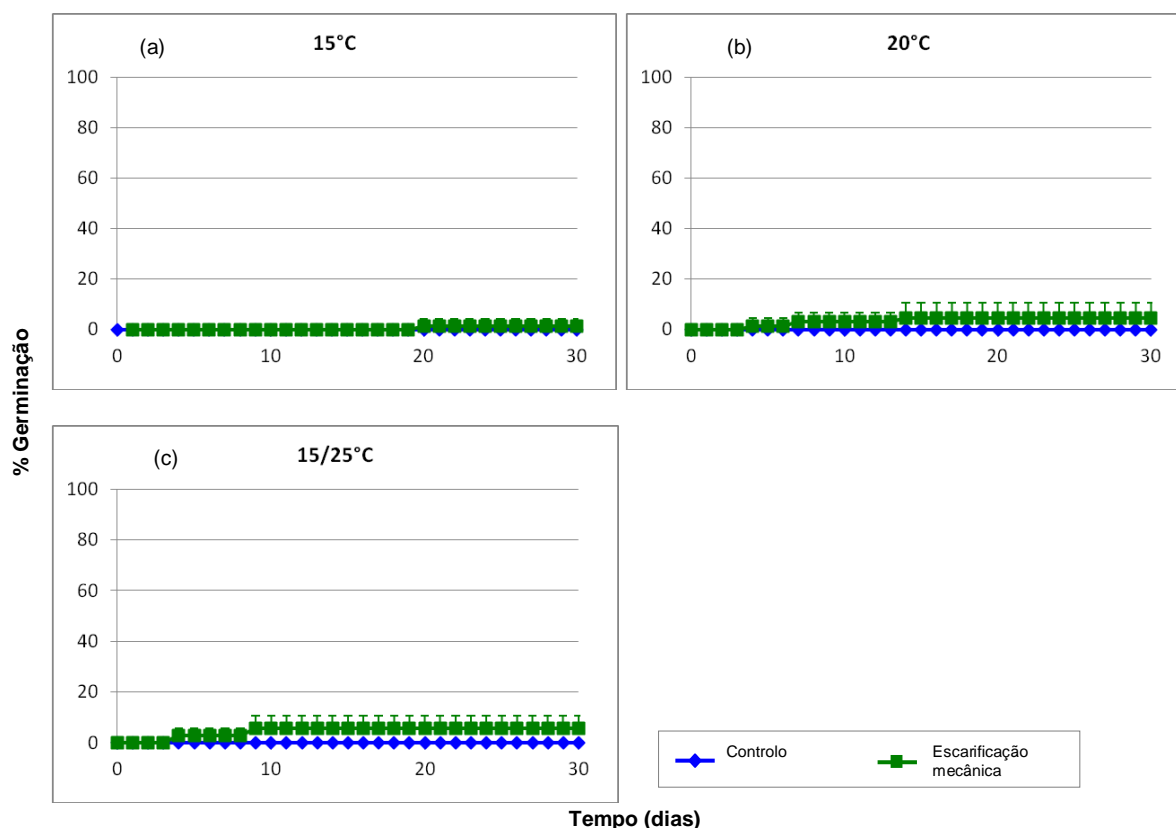


Figura 24

Curvas de germinação de sementes de *A. rosea*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C e em (c) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

No género *Lavatera* as diferenças na germinação máxima entre o controlo e a escarificação dependeram da temperatura: em *L. arborea* a escarificação registou valores superiores ao controlo a 15°C (53% e 82% para controlo e escarificação, respectivamente. Quadro 19, Figura 25) e 25°C (22% e 67% para controlo e escarificação, respectivamente) enquanto em *L. cretica* estas diferenças se registaram apenas a 15°C (3% e 25% para controlo e escarificação, respectivamente. Quadro 19, Figura 26).

Quadro 19

Resultados do teste t para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controlo) na percentagem de germinação máxima de sementes de *L. arborea* e *L. cretica*, incubadas 30 dias em condições controladas em quatro temperaturas (15°C, 20°C, 25°C e 15°/25°C).

Espécie	<i>L. arborea</i>		<i>L. cretica</i>	
	t	p	t	p
15°C	4,137	0,006**	3,630	0,011*
20°C	0,846	0,430 ns	2,341	0,058 ns
25°C	3,368	0,015*	0,343	0,743 ns
15/25°C	0,844	0,431 ns	0,603	0,568 ns

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns – não significativo

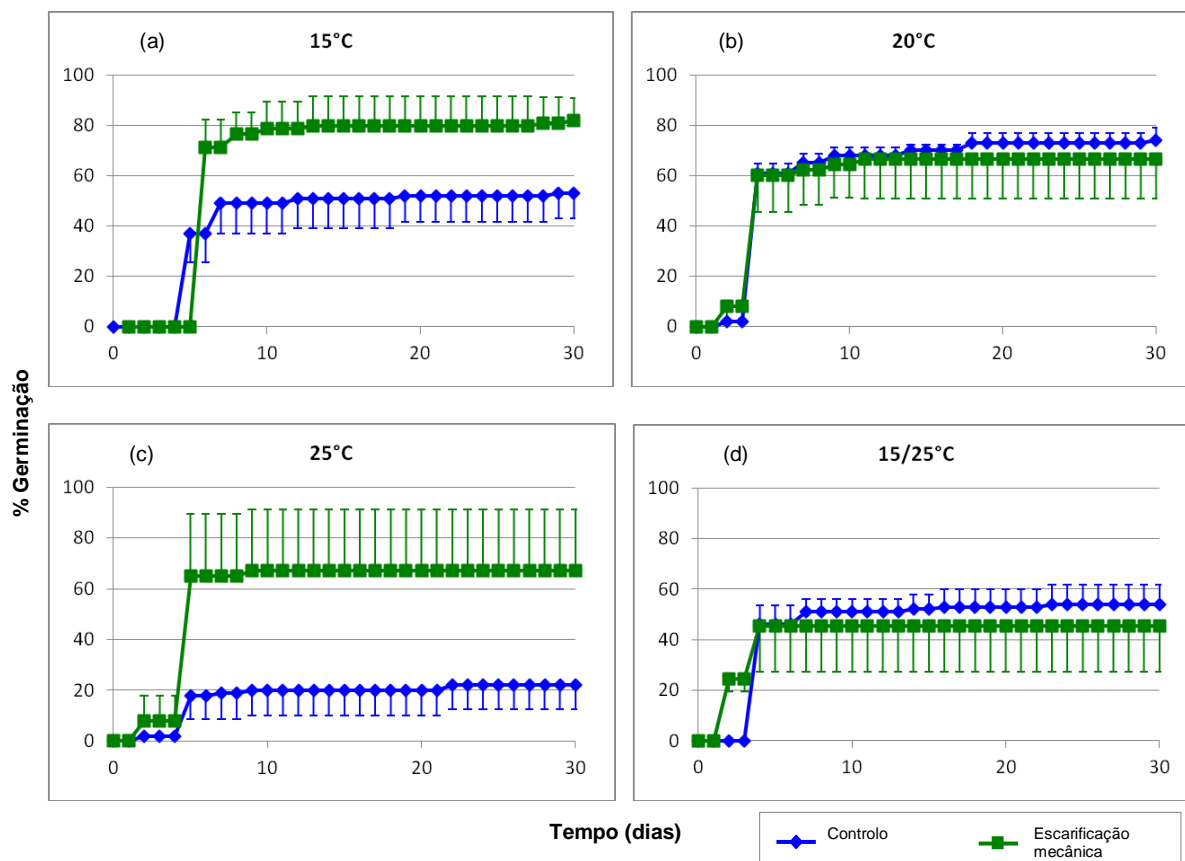


Figura 25

Curvas de germinação de sementes de *L. arborea*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. $n=4$ réplicas de 25 sementes.

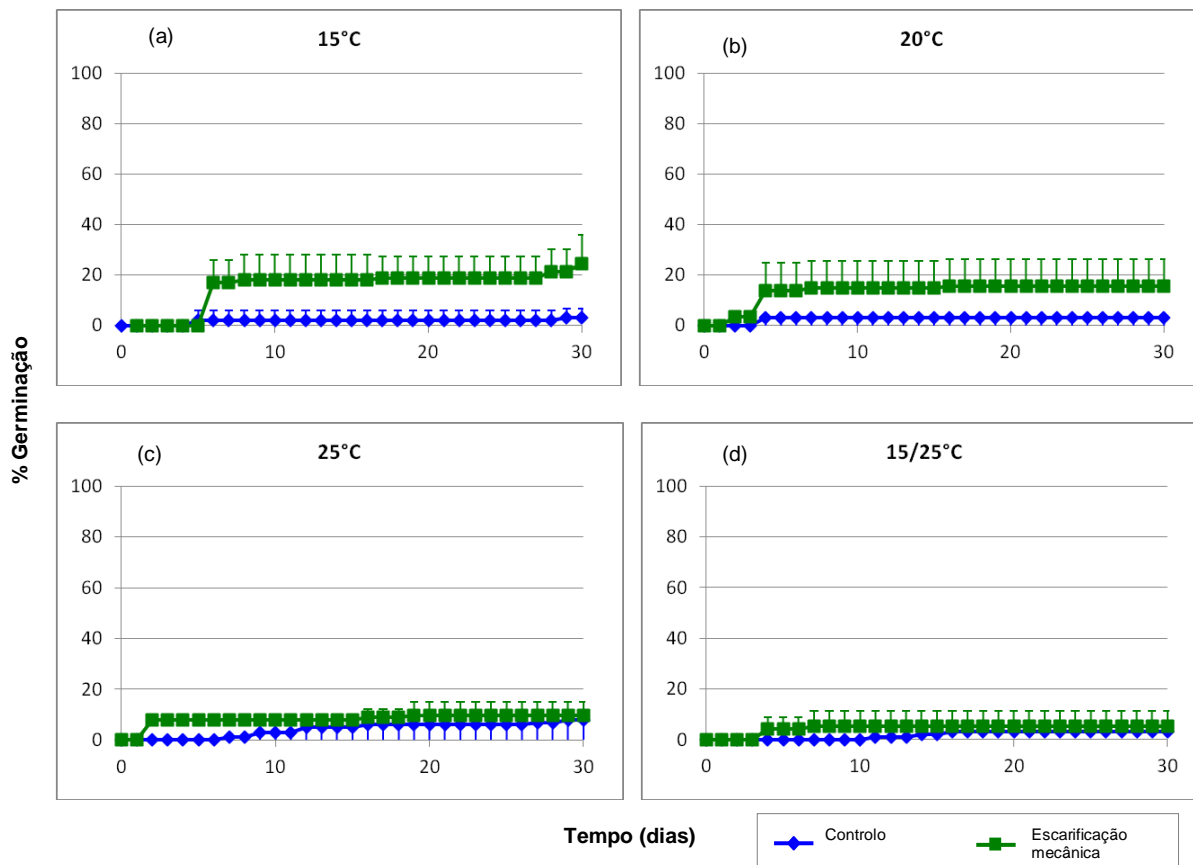


Figura 26

Curvas de germinação de sementes de *L. cretica*, sujeitas a escarificação mecânica e controlo em (a) regime de temperatura constante 15°C; em (b) regime de temperatura constante 20°C; em (c) regime de temperatura constante 25°C e em (d) regime de alternância 15/25°C, todos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

O tratamento teve um efeito significativo no T50 e T10-90 de *L. arborea* (Quadro 20). Contudo, nesta espécie verificou-se uma interacção significativa entre o tratamento e a temperatura para o T50, registando-se diferenças significativas no T50 entre o controlo (3 dias) e escarificação (2 dias) apenas a 15/25°C (Figura 27). O T10-90 registou valores superiores no controlo e inferiores na escarificação (6 e 3 dias, respectivamente, Figura 28).

Quadro 20

Resultados da análise de variância para os efeitos do tratamento (escarificação mecânica e controle) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C) na velocidade de germinação (T50) e na duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *L. arborea* incubadas 30 dias em condições controladas.

	T50		T10-90	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratam.	9,00	0,006**	6,66	0,016*
Temp.	46,33	0,000***	0,42	0,737 ns
Tratam.*Temp.	9,00	0,000***	0,89	0,461 ns

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns – não significativo

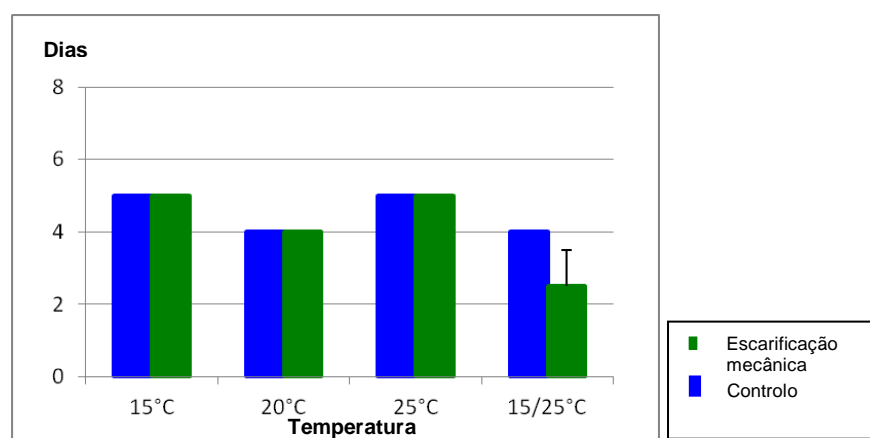


Figura 27

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *L. arborea*, sujeitas a escarificação mecânica em regime de temperatura constante de 15°C; 20°C; 25°C e regime de alternância de 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

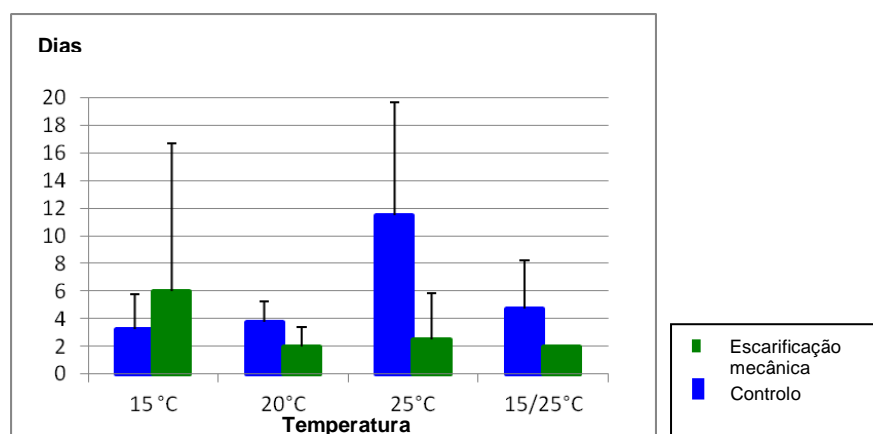


Figura 28

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *L. arborea*, sujeitas a escarificação mecânica em regime de temperatura constante de 15°C, 20°C, 25°C e regime de alternância de 15/25°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

Em *L. cretica* a temperatura teve um efeito significativo no T50 das sementes escarificadas incubadas a 15°C e 20°C (não foram consideradas outras temperaturas devido a germinação muito baixa ou ausência de variância), com valores superiores a 15°C (5 dias) e inferiores a 20°C (3,5 dias) (Quadro 21, Figura 29). A temperatura de germinação não afectou significativamente o T10-90 ($t=1,53$, $p=0,177$, Quadro 21, Figura 30).

Quadro 21

Resultados do teste t para os efeitos da temperatura no T50 e T10-90 de sementes escarificadas de *L. cretica*, incubadas 30 dias em condições controladas a 15°C e 20°C.

	T50		T10-90	
	t	p	t	p
Temp.	01,737	0,133 ns	3,00	0,024*

* $p<0,05$; ns – não significativo

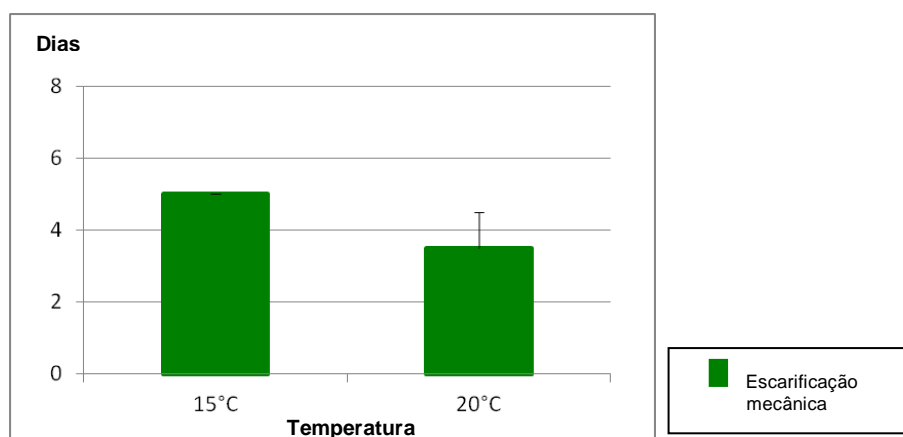


Figura 29

Velocidade de germinação (T50) de sementes de *L. cretica*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. $n=4$ réplicas de 25 sementes.

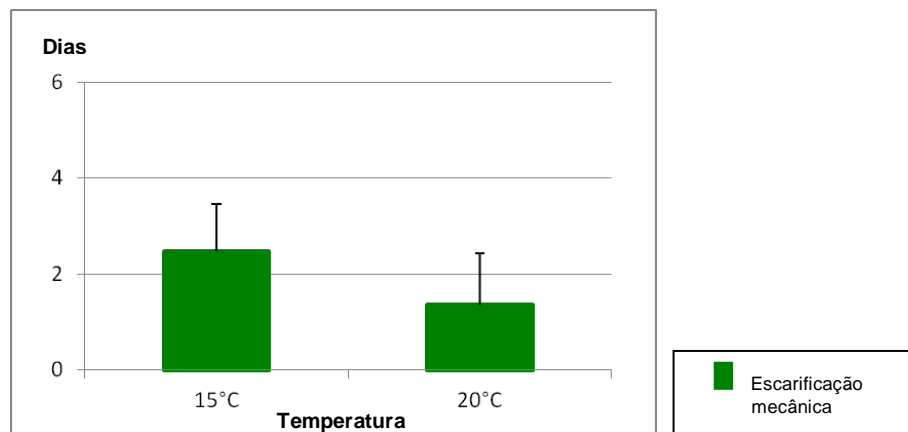


Figura 30

Duração do período de germinação (T10-90) de sementes de *L. cretica*, sujeitas a escarificação mecânica em regimes de temperatura constante de 15°C e 20°C, ambos com fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. n=4 réplicas de 25 sementes.

Família – Scrophulariaceae e Umbelliferae

Neste estudo verificou-se que em todas as espécies destas famílias não ocorreu germinação das sementes para nenhuma das temperaturas e tratamentos aplicados.

Em resultado da dissecação efectuada às sementes não germinadas, observámos que 76-90% das sementes revelava o embrião aparentemente viável na família Scrophulariaceae, apresentando uma cor branca translúcida (Quadro 22). As restantes sementes apresentavam tecidos muito moles e coloração alterada, sendo classificadas como inviáveis. Na família Umbelliferae a percentagem de sementes viáveis foi muito inferior, apenas 15-26% (Quadro 22).

Quadro 22

Resultados da germinação e viabilidade das sementes não germinadas de *S. auriculata*, *S. scorodonia*, *V. litigiosum*, *V. virgatum*, *A. pachycarpa*, *E. foetidum*, *M. gummifera* e *S. olusatrum*, sujeitas a tratamento (estratificação a frio e controlo) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C e 15/25°C), incubadas 30 dias em condições controladas.

Famílias	Espécies	Sementes não germinadas (%)	Sementes viáveis (%)	Sementes inviáveis (%)
Scrophulariaceae	<i>S. auriculata</i>	100	82	18
	<i>S. scorodonia</i>	100	80	20
	<i>V. litigiosum</i>	100	90	10
	<i>V. virgatum</i>	100	76	24
Umbelliferae	<i>A. pachycarpa</i>	100	26	74
	<i>E. foetidum</i>	100	18	83
	<i>M. gummifera</i>	100	15	85
	<i>S. olusatrum</i>	100	24	76

5. DISCUSSÃO

Nesta investigação foi constatado um efeito muito significativo dos pré-tratamentos de germinação em todas as famílias excepto nas Scrophulariaceae e Umbelliferae.

Relativamente às famílias Cistaceae, Fabaceae e Malvaceae o nosso estudo confirmou a necessidade de aplicar o pré-tratamento de escarificação para permitir a quebra de dormência física existente nas sementes (Baskin & Baskin, 2001; ENSCONET, 2009b).

Na família Cistaceae, o pré-tratamento de escarificação térmica aumentou significativamente a germinação máxima de *Tuberaria lignosa* e marginalmente em *Halimium lasianthum* (os efeitos não se revelaram significativos nesta espécie). A *T. lignosa* revelou uma percentagem média de germinação para a escarificação de 19% e o *Halimium lasianthum* de 14%.

Noutro estudo, com sementes do género *Halimium*, a espécie *H. halimifolium* demonstrou ter fraca capacidade germinativa tendo sido obtido para a escarificação térmica (70-75°C, 30 minutos) à luz 14% e no escuro 8%. Estes resultados foram justificados pela presença na semente de complexos mecanismos de dormência, originada provavelmente na natureza lipídica da exoderme, actuando como barreira à entrada de água e oxigénio (Peña *et al.*, 1988). Também Thanos *et al.* (1992) estudaram esta espécie sujeitando-a a dois tratamentos, um de escarificação mecânica (abrasão com lixa) e outro de escarificação térmica (1minuto a 100°C) e depois colocada 15°C no escuro, tendo obtido um resultado de germinação superior a 70%.

Segundo MADRP (2000), a aplicação do pré-tratamento de escarificação química com ácido sulfúrico (H₂SO₄) durante 15 minutos e sujeição a 15°C, no escuro nas sementes de *Halimium halimifolium*, apresentou baixa percentagem de germinação (12%). Já quando foi aplicada a escarificação química com nitrato de potássio (KNO₃) a 0,2%, durante 60 minutos a percentagem de germinação do *H. halimifolium* também foi baixa (10%, 15°C, no escuro).

Assim, e tendo em conta os resultados inferiores obtidos no nosso estudo, parece-nos importante testar a aplicação conjunta de dois tratamentos de escarificação (mecânica e térmica), a diminuição do tempo de sujeição das sementes a elevada temperatura (para 1 minuto), com a condição de germinação a 15°C no escuro. No nosso trabalho esta

temperatura de germinação não foi testada em virtude do reduzido número de sementes disponíveis.

A temperatura não teve efeitos significativos na germinação máxima de nenhuma das espécies mas teve efeito significativo na velocidade de germinação das sementes escarificadas de *T. lignosa*. Os valores de T50 revelados no nosso estudo foram melhores aos obtidos por Moreira *et al.* (2010), em que as sementes de *T. lignosa* foram sujeitas à temperatura de 20°C tiveram T50 de 36 dias, em condições experimentais diferentes, já que as sementes sofreram escarificação térmica a 120°C durante 5 minutos, sendo colocadas num substrato de Agar a 7% no escuro.

Para a germinação das sementes de *Tuberaria lignosa*, os melhores resultados para germinação máxima e T50 foram obtidos com escarificação térmica, com exposição a 115°C, durante 10 minutos, a que foram sujeitas, pois verificou-se o seu efeito significativo na germinação máxima (24%) quando as sementes foram sujeitas à temperatura de germinação de 15°/25°C. Contudo, a germinação máxima obtida foi baixa, o que se pode dever à perda de viabilidade das sementes ou à fraca resposta do lote estudado face ao tratamento térmico aplicado. Moreira *et al.* (2010) obtiveram valores superiores aos deste estudo: germinação máxima de 44% com exposição a 100°C durante 10 minutos e, 66% a 120°C durante 5 minutos quando incubadas a 20°C.

Na família Cistaceae verifica-se uma grande ocorrência de sementes que são estimuladas pela presença do fogo (Ferrandis *et al.*, 1999). Assim, por forma a simular estas condições em laboratório, as sementes são frequentemente sujeitas a um tratamento térmico a 80°-100°C, durante 5 a 30 minutos, para obter percentagens de germinação elevadas (Thanos & Georghiou, 1988). Ou conforme nos sugere o estudo de González-Rabanal e Casal (1995) para as espécies *H. alyssoides* e *T. guttata*, onde as sementes foram expostas a 110°C durante 5 minutos e colocadas em germinação a 20°C, obtendo-se uma percentagem de germinação de 48,5%.

No trabalho de Doussi e Thanos (1994) foi aplicado o pré-tratamento de escarificação térmica, por imersão da semente em água a 100°C durante 7 e 40 segundos para quebrar a dormência das sementes de *Cistus creticus* e *Fumana thymifolia* respectivamente, sendo depois colocadas a 20°C no escuro para germinar. Para o *C. creticus* foi revelada uma percentagem de germinação de 100% e para a *F. thymifolia* de 90%.

Em súmula, e tendo em conta os estudos anteriores, exceptuando os de Doussi e Thanos (1994) são frequentes as percentagens de germinação que não atinjam 80%, apesar dos tratamentos aplicados, confirmando-se igualmente no nosso trabalho. Os resultados podem variar muito com a temperatura e tempo de exposi   o do tratamento, e como o n  mero de sementes poderá não ser suficiente para testar todas as combina   es possíveis, sugerimos, a aplica   o de tratamento de escarifica   o térmica diminuindo a temperatura para os 110 C e a dura   o para 5 minutos, como uma alternativa para obter melhores resultados. Este procedimento   mais seguro, pois relativamente   escarifica   o mecânica ou ácida diminui a vulnerabilidade das sementes   destrui   o substancial do tegumento (Doussi & Thanos, 1994).

Na família Fabaceae as espécies do nosso estudo apresentaram diferentes padrões de germina   o máxima, tendo em conta os valores médios de todos os tratamentos. A espécie *Adenocarpus complicatus* revelou uma percentagem de 90%, a *Cytisus villosus* 76% e a *Vicia sativa subsp. nigra* 59%.

Nesta família a escarifica   o mecânica teve efeito significativo na germina   o máxima da espécie *Adenocarpus complicatus* e do *Cytisus villosus*, apresentando valores médios de 90% e 76% respectivamente. Em *C. villosus* e *V. sativa* os efeitos do tratamento variaram com a temperatura. Este tratamento permitiu ainda aumentar a velocidade de germina   o e reduzir a dura   o do período de germina   o, embora estes efeitos tenham variado com a espécie e a temperatura. Este processo de quebra de dormência física nesta família   corroborado por outros estudos que afirmam ser a impermeabilidade do tegumento a principal causa de ausência de germina   o das sementes (Baskin & Baskin, 2001; Devesa *et al.*, 2000; González-Melero *et al.*, 1997).

No *A. complicatus*, o nosso estudo concluiu que a germina   o máxima se aproxima de 91%   temperatura de germina   o de 15 C e fotoperíodo de 8/16 horas. Estes resultados foram semelhantes aos divulgados pela KEW (2012) num estudo com esta espécie, onde a taxa de germina   o foi de 85%, obtida em sementes escarificadas (corte do tegumento).

No entanto, a ENSCOBASE (2012) apresenta os melhores resultados, verificando-se uma taxa de germina   o de 100% em sementes sujeitas a escarifica   o mecânica (com bisturi), quando sujeitas   temperatura de 16 C em substrato de agar a 1% e fotoperíodo 12/12 horas. Este resultado poderá indicar ser este método de escarifica   o mecânica mais eficaz para obter elevada germina   o, conjugando com as condi   es de germina   o descritas anteriormente para esta espécie.

No *Cytisus villosus* o tratamento mostrou maior eficácia no aumento da germinação máxima à temperatura de 15°C do que à temperatura de 20°C, tendo-se aproximado dos 90%. A velocidade de germinação foi igualmente superior nas sementes com pré-tratamento. Os autores Añorbe *et al.* (1990) e Comide (2001) afirmam que a escarificação manual propicia um aumento da germinação, aproximando-a de 100%, para espécies do género *Cytisus*. Corroborando estes autores, a Kew (2012), divulga o resultado da escarificação mecânica das sementes desta espécie, submetidas à temperatura de 11°C e fotoperíodo de 12/12 horas, onde foi obtida uma germinação de 100%.

No estudo desenvolvido por Vasconcelos *et al.* (2008), foi utilizada a escarificação com ácido sulfúrico durante 15-40 minutos, sendo obtida uma germinação de apenas 50%, bastante inferior aos resultados obtidos nos estudos apresentados anteriormente.

A temperatura teve efeito significativo na duração da germinação de *Cytisus villosus*, afectando a resposta ao tratamento.

Na *Vicia sativa subsp. nigra*, apenas para a temperatura de 20°C é que a escarificação revelou uma percentagem de germinação máxima de 74%, tendo nas restantes temperaturas apresentado valores inferiores aos do controlo, com um valor médio de 60%. O tratamento reduziu significativamente a velocidade de germinação desta espécie. À mesma temperatura de 20°C a KEW (2012), obteve uma melhor percentagem de germinação (100%) com iguais condições de fotoperíodo, utilizando a escarificação por remoção de parte do tegumento com bisturi e substrato de agar a 1%.

Também esta base de dados da KEW (2012) indica outros métodos de quebrar a dormência que se revelaram eficazes na percentagem de germinação (100%), tais como: a imbibição da semente em água, durante 4 dias a 21°C e posterior escarificação com corte e remoção de tegumento, colocada a germinar a 21°C, com um fotoperíodo de 12/12 horas; ou a utilização do mesmo método de escarificação, em que as sementes foram colocadas a 16°C, 21°C ou 21°/11°C.

No nosso estudo a percentagem de germinação foi inferior à obtida nos estudos acima citados e o controlo apresentou em duas temperaturas (15°C e 25°C), valores superiores ao da escarificação. Estes resultados poderão ter origem em condicionalismos inerentes ao processo de escarificação, ou eventualmente podemos considerar que o método de abrasão com lixa não seja o mais eficaz, podendo ter danificado o embrião e outros tecidos, devido à

pressão infligida. Durante o período de germinação as sementes apresentavam um aspecto mole.

Tendo em conta as investigações apresentadas, o resultado do nosso estudo poderia ser melhorado com a aplicação de tratamento de escarificação mecânica com corte do tegumento por forma a reduzir potenciais danos no embrião e em outros tecidos da semente. No caso do *Cytisus villosus* sugerimos a diminuição da temperatura de germinação para o intervalo entre os 11ºe 15ºC para melhorar germinação máxima.

Na família Malvaceae as espécies do nosso estudo apresentaram diferentes padrões de germinação máxima, considerando os valores médios de todos os tratamentos. A espécie *Lavatera arborea* revelou uma percentagem de 58%, a *Lavatera cretica* 9% e a *Alcea rosea* 1%. A escarificação teve um efeito significativo neste parâmetro nas três espécies desta família, contribuindo assim para a quebra da dormência física das sementes, embora este efeito esteja dependente da temperatura no género *Lavatera*. A duração do período de germinação foi reduzida com a aplicação do pré-tratamento numa das espécies (*L. arborea*).

Este trabalho concluiu a existência de efeito significativo da temperatura na germinação máxima e na velocidade de germinação que influenciou a resposta ao tratamento aplicado nas duas espécies do género *Lavatera*. Em *L. arborea* a escarificação aumentou significativamente a germinação a 15ºC e a 25ºC, enquanto em *L. cretica* este efeito se registou apenas a 15ºC. Para esta temperatura, a escarificação aumentou ainda a velocidade de germinação desta última espécie. A aplicação de tratamento aumentou a velocidade de germinação de *L. arborea* apenas a 15/25ºC. Porém, a diferença entre controlo e escarificação registada foi de apenas um dia.

A germinação máxima obtida para as duas espécies do género *Lavatera* foi contudo inferior aos resultados revelados pela KEW (2012), em que à temperatura de 10ºC germinaram 100% (*L. arborea*) e 90% (*L. cretica*) das sementes. Todavia, Galmés *et al.* (2006) estudaram outra espécie do género *Lavatera* (*Lavatera maritima*) onde aplicaram regimes de temperatura em alternância 10/20ºC e 5/15ºC, não atingindo a germinação máxima valores superiores a 40%.

A variação na percentagem final de germinação pode dever-se à qualidade das sementes do lote utilizado ou à forma como foi aplicado o tratamento de escarificação o qual poderá ter provocado danos no embrião de algumas sementes, impossibilitando-o de germinar.

Na *A. rosea* não se verificou germinação no controle e a germinação máxima foi muito diminuta na escarificação (2,7%), de acordo com as condições de germinação do nosso trabalho. Já no estudo publicado pela KEW (2012) a percentagem de germinação foi de 80%, quando as sementes foram sujeitas à temperatura de 21°C e fotoperíodo de 12/12 horas. A baixa percentagem de germinação obtida para *A. rosea* pode ter resultado de uma deficiente aplicação do tratamento de escarificação, onde o embrião possa ter sido danificado.

Considerando os estudos referenciados anteriormente, pensamos que, relativamente ao género *Lavatera*, a germinação máxima das sementes poderia ser melhorada com a aplicação de escarificação com corte do tegumento, reduzindo os problemas de danificação do embrião e outros tecidos, bem como com a diminuição da temperatura de germinação para os 10°C.

As sementes das famílias Scrophulariaceae e Umbelliferae não germinaram após terem sido sujeitas ao pré-tratamento de estratificação a frio a 4°C em câmara frigorífica durante 30 dias e depois colocadas em câmara de germinação em diferentes condições de temperatura.

Da análise da dissecação das espécies *Scrophularia auriculata*, *Scrophularia scorodonia*, *Verbascum litigiosum*, *Verbascum virgatum*, verificou-se que muitas sementes tinham um embrião aparentemente viável, embora não tenha germinado. Na dissecação da *Angelica pachycarpa*, *Elaeoselium foetidum*, *Margotia gummifera* e *Smyrniolum olusatrum* foi revelada a presença de tecidos moles e de coloração alterada.

Na família Scrophulariaceae a percentagem de sementes aparentemente viáveis foi de 82% e na família Umbelliferae foi de 21%. A ausência de germinação de sementes aparentemente viáveis pode significar que a dormência morfofisiológica ou fisiológica, presentes em ambas as famílias (Baskin & Baskin, 2001), não foi quebrada com o pré-tratamento aplicado.

As sementes dos géneros *Angelica*, *Elaeoselium*, *Margotia* e *Smyrniolum* poderão manifestar dormência morfofisiológica, pois na família Umbelliferae a que pertencem esta ocorrência é muito frequente (Baskin & Baskin, 2001). Assim, embora o pré-tratamento de estratificação do nosso estudo não tenha contribuído para a germinação do lote de sementes, podia segundo Baccheta *et al.* (2008), facilitar a quebra de dormência morfofisiológica, embora não tenham evidenciado a duração do mesmo. Num estudo realizado por Vandeloos *et al.*

(2007) com a espécie *Chaerophyllum temulum* desta família, foi evidenciada a ocorrência de germinação de sementes no decorrer do tratamento de estratificação a 5°C com a duração de 8 semanas (em cerca de 8,9%), tendo aumentado para 20,5% com a duração de 12 semanas. Da análise do estudo anterior, pode sugerir-se que o período de estratificação aplicado no nosso estudo teve uma duração reduzida, não contribuindo assim para a quebra de dormência das sementes.

A aplicação de ácido giberélico (GA₃) pode igualmente contribuir para a quebra de dormência fisiológica (Baskin & Baskin 2001). Em 2008, Nurse e Cavers estudaram a espécie *Scrophularia marilandica*, tendo concluído que a imbibição das sementes em 10 ml de solução de GA₃ (3×10^{-4} M) durante 2 semanas e sujeitas à temperatura alternada de 25°/10°C contribuiu para a germinação total e mais rápida das mesmas.

Desta forma, sugerimos que para estudos futuros de germinação de espécies desta família, sejam testadas durações do tratamento de estratificação fria entre 2 a 3 meses ou a aplicação de GA₃.

Os dados referenciados na bibliografia consultada sobre a família Scrophulariaceae, que apresenta dormência fisiológica (Baskin & Baskin, 2004), indicam a ocorrência de percentagens de germinação elevadas para sementes conservadas em bancos de sementes, em detrimento das sementes recentemente recolhidas em condições de temperatura e fotoperíodo não muito diferentes das testadas neste estudo, como se apresenta seguidamente.

Para o género *Scrophularia*, a base de dados da KEW (2012) revela dados importantes para as condições da germinação da espécie *Scrophularia auriculata* para sementes conservadas a -20°C durante 6 anos, as quais foram colocadas sob substrato de agar 1%, sem qualquer pré-tratamento, tendo germinado, à temperatura de 11°C e fotoperíodo 12/12 horas, 100% da amostra e, 89% das sementes germinaram, à temperatura de 25°/10°C e fotoperíodo 8/16 horas.

Segundo KEW (2012), para a espécie *Scrophularia scorodonia*, conservada a -20°C durante um ano, colocada sob substrato de agar 1%, sem qualquer pré-tratamento, germinou à temperatura de 16°C e fotoperíodo 12/12 horas, 100% da amostra. Outro lote de sementes foi sujeito a um pré-tratamento de imbibição em agar a 1% durante 4 semanas a 2°C, quando colocado a 23°/9°C e fotoperíodo 12/12 horas, também germinaram 100% das

sementes. A aplicação deste pré-tratamento a uma temperatura mais baixa (2°C), e posterior colocação em condições de germinação de temperatura alternada (23°/9°C), onde a temperatura mais baixa foi 6°C inferior à do nosso estudo, parece ter contribuído para a quebra da dormência das sementes, facto que não se verificou nos nossos resultados.

Num estudo apresentado por Munt *et al.* (2009) foi revelado que, relativamente a outra espécie do mesmo género (*Scrophularia digitalis dubia*), com 32 anos de armazenamento germinaram cerca de 94% das sementes, quando sujeitas à temperatura de germinação de 25/15°C, sem recurso a qualquer pré-tratamento.

A GENMEDOC (2006) divulga dados referentes à espécie *S. ramosissima* que sujeita a um pré-tratamento de imbibição em água destilada durante 48 horas e depois colocada em placa de *Petri* com agar a 0,6% a 20°C e fotoperíodo de 12/12 horas, revela uma germinação de 66,3% \pm 16% e T50 de 6,4 dias. A mesma fonte aponta outro protocolo onde a germinação é testada sem pré-tratamento a 20°C, apresentado uma germinação bastante inferior (25,0% \pm 5 %).

No que diz respeito ao género *Verbascum*, KEW (2012) apresentou os resultados obtidos na germinação da espécie *Verbascum virgatum*, sujeita a escarificação física, colocada sob substrato de agar 1%, tendo germinado às temperaturas de 20°C e 25°C com fotoperíodo 8/16 horas, 100% das amostras.

Também a ISTA (2007) revelou os dados resultantes da germinação de outras três espécies, *V. densiflorum*; *V. phlomoides* e *V. thamus*, sujeitas ao pré-tratamento de estratificação, cuja duração não foi notificada, e que foram colocadas à temperatura de incubação de 20°/30°C, tendo sido obtido o T50 de 4 a 7 dias e T10-90 de 21 dias.

A GENMEDOC (2006) apresentou o resultado obtido em testes de germinação da espécie *V. plantaginum* onde não foi aplicado nenhum pré-tratamento, sendo as sementes colocadas em placa de *Petri* com papel de filtro humedecido, a 15°C, revelando uma germinação de 89,0% \pm 3,3% e T50 de 9,3 dias. Esta entidade recomenda a não aplicação de pré-tratamentos e o intervalo de temperatura de germinação entre 5°C e 20°C, preferencialmente a 10°C e 15°C.

A percentagem de germinação varia com os tratamentos aplicados e, em geral, com e sem tratamento revela-se semelhante.

Na família Umbelliferae, a ISTA (2007) indica para outra espécie do género *Angelica*, a espécie *Angelica archangelica*, o pré-tratamento de estratificação a 6°C durante 8 semanas, como método de quebra de dormência, sendo as sementes posteriormente sujeitas à temperatura de germinação de 20/30°C.

Para a espécie *Smyrmiium olusatrum*, a KEW (2012) revelou os resultados obtidos quando as sementes sujeitas a tratamento prévio, foram colocadas em substrato de agar 1%, tendo germinado, aos 10°C com fotoperíodo 8/16 horas, 100% da amostra e, aos 11°C com fotoperíodo de 12/12, 88% do lote. Divulga igualmente um estudo em que as sementes foram sujeitas ao pré-tratamento de imbibição em agar a 1% durante 4 semanas a 26°C e 8 semanas a 6°C, colocadas a germinar em agar a 1% + 250mg/l de GA₃, com o fotoperíodo de 12/12 a 20°C, verificando-se uma taxa de germinação de 76%.

No que diz respeito às espécies *Elaeoselium foetidum* e *Margotia gumifera*, na revisão de literatura desenvolvida não se encontraram, para estas espécies, registos de ensaios de quebra de dormência.

De acordo com os dados obtidos nos estudos anteriormente apresentados, indicamos que em futuros testes de germinação possam ser experimentadas estas outras condições de germinação, já que as testadas no nosso trabalho, embora algumas relativamente próximas dos referido estudos, não revelaram capacidade de quebrar a dormência das sementes das famílias Scrophulariaceae e Umbelliferae estudadas.

Pelos resultados obtidos na nossa investigação, é também levantada a suspeita de que uma parte das sementes utilizadas nos testes de germinação fosse inviável, tendo em conta o *test-cut* realizado, tal facto pode ter origem no envelhecimento das sementes e em deficientes condições de acondicionamento. A confirmação desta condição só seria possível se tivesse sido realizado o teste de viabilidade com tetrazólio antes do início da experiência.

Dadas as dificuldades dos bancos de sementes que colhem, manuseiam e conservam uma grande diversidade de tipos de sementes e frutos, com características muito variadas relativamente ao peso, forma, tamanho e fisiologia, o que acarreta problemas de homogeneização e generalização dos processos; as dificuldades inerentes ao trabalho com sementes autóctones, cujo tamanho da amostra total é muitas vezes diminuto e as sementes se encontram em diferentes estádios de maturidade na fase da colheita (Draper *et al.*, 2004) e também à contrariedade do desconhecimento das condições óptimas de germinação e o método para a quebra da dormência (ENSCONET, 2009a); é essencial que

estas entidades estabeleçam protocolos de germinação suficientemente flexíveis para que se possam adequar às diferentes sementes (Villamil & Laborde, 2001).

Assim, segundo a análise do nosso estudo, tendo em conta os melhores resultados obtidos e apesar de não se terem manifestado como exemplares, recomendamos para as espécies estudadas das famílias Cistaceae, Fabaceae e Malvaceae, as seguintes aplicações de pré-tratamento das sementes e condições de germinação em termos de temperatura aconselhada com fotoperíodo de 8 horas de luz/16 horas de escuro, que permitam a monitorização das sementes conservadas:

Tuberaria lignosa - Aplicação de pré-tratamento de escarificação térmica (exposição a 115°C, durante 10 minutos) à temperatura de incubação de 20°C. A aplicação de escarificação térmica com exposição das sementes a 110°C durante 5 minutos poderá melhorar a percentagem de germinação (González-Rabanal e Casal, 1995).

Halimium lasianthum - Aplicação de pré-tratamento de escarificação térmica (exposição a 115°C, durante 10 minutos em estufa) à temperatura de incubação de 15°/25°C. A percentagem de germinação desta espécie poderá ser melhorada se esta for sujeita a um tratamento conjunto de escarificação mecânica (abrasão com lixa) e escarificação térmica durante 1 minuto a 100°C e depois colocada 15°C no escuro (Thanos *et al.*, 1992).

Adenocarpus complicatus - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (abrasão com lixa) à temperatura de incubação de 15°C e 20°C. Os resultados poderão ser melhorados se a escarificação mecânica for realizada através do corte do tegumento com bisturi (KEW, 2012).

Cytisus villosus - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (abrasão com lixa) à temperatura de incubação de 15°C. Poderemos melhorar a intervenção aplicando a escarificação mecânica com corte de tegumento com bisturi (KEW, 2012).

Vicia sativa subsp. nigra - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (abrasão com lixa) à temperatura de incubação de 20°C. Este tratamento pode apresentar melhores resultados com a aplicação de escarificação mecânica com corte de tegumento com bisturi (KEW, 2012).

Alcea rosea - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (corte e remoção de parte do tegumento com bisturi) à temperatura de incubação de 20°C.

Lavatera arborea - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (abrasão com lixa) à temperatura de incubação de 15°C. Para melhorar os resultados obtidos poderemos utilizar a temperatura de incubação de 10°C (KEW, 2012).

Lavatera cretica - Aplicação de pré-tratamento de escarificação mecânica (abrasão com lixa) à temperatura de incubação de 15°C. A sujeição das sementes à temperatura de incubação de 10°C, poderá contribuir para um melhor resultado da percentagem de germinação.

Relativamente às espécies estudadas das famílias Scrophulariaceae e Umbelliferae, sugerimos a sejam realizados teste de germinação com tratamento de estratificação fria entre 2 a 3 meses (Vandelook *et al.*, 2007) ou a aplicação de GA₃ (Baskin & Baskin 2001; Nurse & Carvers, 2008).

Neste contexto, pensamos que os dados obtidos no nosso estudo poderão contribuir para um maior e melhor conhecimento de algumas espécies autóctones que se encontram ou poderão ser conservadas no banco de sementes.

Os pré-tratamentos e condições de germinação anteriormente apresentadas, podem ser aplicadas directamente em algumas das espécies, em testes de germinação futuros com o objectivo de monitorizar a viabilidade das sementes conservadas em bancos de sementes. Porém, em outras espécies (e.g. *A. rosea*, *Scrophularia auriculata*, *Scrophularia scorodonia*, *Verbascum litigiosum*, *Verbascum virgatum*, *Angelica pachycarpa*, *Elaeoselinum foetidum*, *Margotia gummifera* e *Smyrnium olusatrum*), como a percentagem de germinação revelada foi muito baixa ou mesmo nula, não será possível utilizar as condições testadas para estimar a viabilidade das sementes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo final do trabalho, aproveitamos a oportunidade para realçar a importância que esta investigação representou no aprofundar o conhecimento dos testes de germinação utilizados nas espécies vegetais estudadas, contribuindo desta forma para a sua optimização.

O bom conhecimento da capacidade de germinação das sementes e dos requisitos das espécies autóctones é essencial para a conservação da biodiversidade e a sua futura gestão nos bancos de sementes (Galmés *et al.*, 2006).

Esta necessidade de conhecer as melhores condições de germinação de espécies autóctones, obriga-nos à tomada de consciência sobre a igual e premente necessidade de conhecer melhor a nossa flora, bem como os seus factores de ameaça ou mesmo a forma de orientar e gerir os seus habitats, nomeadamente na espécie *Verbascum litigiosum* que, segundo o ICNB (2006), se encontra ameaçada devido à alteração do seu habitat pelo alargamento urbanístico e turístico ou mesmo pela erosão.

Para que muitas espécies não se extingam devido às várias ameaças a que está sujeito o seu ecossistema, tais como: o pisoteio, a prática de motociclismo, a extracção de areias, o campismo selvagem, a construção de vias de comunicação ou outras infra-estruturas e, o aumento da pressão humana na colheita de exemplares da flora espontânea (Quaresma, 1993; Pité & Avelar, 1996), é importante o papel desenvolvido pelo bancos de sementes por conservarem em boas condições de acondicionamento e viabilidade as sementes de plantas autóctones, contribuindo assim para a diminuição da perda de biodiversidade (Red de Jardines Botánicos, 2001; BGCI, 2010).

Este trabalho desenvolvido em parceria com o Banco de Sementes António Luís Belo Correia, contribuiu para identificar quais os pré-tratamentos e as condições de germinação das espécies autóctones estudadas, possibilitando assim a sua implementação futura na monitorização da viabilidade das sementes conservadas nos bancos de sementes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W., Aveling, R., Brockington, D., Dickson, B., Elliott, J., Hutton, J., Roe, D., Vira, B. & Wolmer, W. (2004). Biodiversity conservation and the eradication of poverty. *Science*, 306, 1146-1149.
- Alegria, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras e amenazadas. *Invest. Agro.: Prod. Veg. Vol 16* (1), 6-24.
- Añorbe, M.; Gutiérrez, J.; Fernández, M. & Santos, B. (1990). Influencia de la temperatura sobre la germinación de semillas de *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet y *Cytisus oromediterraneus*. *Riv. Mar. Studia Oecologica*, VII, 85-100.
- Azedo, A. (2003). Biodiversidade: Aposta na conservação. *Floresta e Ambiente*. 16 (16), 27-28.
- Bacchetta, G., Ballesteros, D., Belletti, P., Brullo, S., Bueno, A., Cagelli, L., Castillo, M., Carasso, V., Carrió, E., Casas, J., Castells, J., Cervelli, C., Draper, D., Baeza, M., Fenu, G., Gómez-Campo C., Gorian, F., Grillo, O., Güemes, J., Jiménez-Alfaro, B., Marques, I., Mattana, E., Mulè, P., Nepi, M., Pacini, E., Pavone, P., Piotto, B., Pontecorvo, C., Prada, A., Martínez, F., Venora, G., Vietto, L. & Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ y diversidad vegetal*. Oviedo: La Caixa.
- Barcelló Coll, J., Rodrigo, G., García, B. & Tamés, R. (1992). *Fisiología Vegetal* (6.^a ed.). Madrid: Ediciones Pirámide.
- Baskin, C. & Baskin, J. (2001). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, CA: Academic Press.
- Baskin, C. & Baskin, J. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14, 1-16.
- Bernejo, J. (1994). Introducción a las técnicas de conservación. In J. Bermejo & M. Muñoz (Eds), *Protección de la Flora en Andalucía* (pp.125-131). Sevilla: Agencia de Medio Ambiente - Junta de Andalucía.

- Bewley, J. & Black, M. (1982). *Physiology and biochemistry of seeds: Vol. II*. New York: Springer-Verlag.
- BGCI (2000). Internacional Agenda for Botanic Garden in Conservation. Consultado em 27 de Março de 2011 através de <http://www.bgci.org/resources/1528/>.
- BGCI (2010). Global strategy for plant conservation. Surrey: Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Consultado em 10 de Setembro de 2012 através de http://www.bgci.org/ourwork/gspc_targets/
- Boesewinkel, F & Bouman, F. (1995). The seed: Structure and function. In J. Kigel & G. Galili (Eds.), *Seed development and germination* (pp. 1-24). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bouthrin, D. & Bron, G. (2000). *Multiplicação de plantas*. Mem Martins: Publicações Europa-América.
- Caixinhas, L. (1988). *Aspectos ecológicos da germinação de sementes de infestantes*. Tese de Doutoramento em Biologia. Universidade de Lisboa.
- Carapeto, C. (1998). *Educação ambiental*. Lisboa: Universidade Aberta.
- Cardoso, J. (2008). Germinação. In G., Kerbaury (Coord.). *Fisiologia vegetal*. (pp. 384-408). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Carolino, S. (1998). *Germinação de espécies arbóreas e arbustivas*. Trabalho de Fim de Curso em Engenharia Agronómica. Lisboa: ISA.
- Castroviejo S., Laínz M., López-González, G., Montserrat, P., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz-Garmendia F., Navarro, C., Paiva J. & Soriano C. (Eds.), (1993). *Flora ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: Vol III. Plumbaginaceae (Partim) - Capparaceae*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- CCE (2006). *Travar a perda de biodiversidade até 2010 – E mais além: Preservar os serviços ecossistémicos para o bem-estar humano*. Bruxelas: Comissão das Comunidades Europeias.

- Chin, H. & Roberts, E. (1980). *Recalcitrant crop seeds*. Kuala Lumpur: Tropical Press SDN.BHD.
- Côme, D. (1970). *Les obstacles à la germination*. Paris: Masson & CIE.
- Copeland, L. & McDonald, M. (1995). *Principles of seed science and technology*. (3.rd ed.). New York: Chapman & Hall.
- Cornide, T. (2001). *Dinámica de las comunidades de Cytisus striatus (Hill) Rothm. y Cytisus multiflorus (L' Hér.) Sweet en la Galicia interior*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Dajoz, R. (2005). *Princípios de ecologia*. (7.ª Ed.). Porto Alegre: Artmed Editora.
- Davis, M.S. & Shaw, R.G. (2001). Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science* 292, 673-679.
- Desai, B., Kotecha, P. & Salunkhe, D. (1997). *Seeds handbook – Biology, production, processing and storage*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Devesa, J., Ruiz, T. & Buzo, G. (2000). Ensayos de germinación en espécies de *Ononis L.* (Fabaceae) del SW de España. *Collect Bot. (Barcelona)* 25, 195-205.
- Draper, D., Marques, A., Graell, A., Costa, F. & Martins-Loução, M. (2004). *Conservação de recursos genéticos: O Banco de sementes António Luís Belo Correia*. Lisboa: Jardim Botânico-Museu Nacional de História Natural. Consultado em 04 Abril de 2012 através de <http://webpages.fc.ul.pt/~maloucao/ColeccoesBS.pdf>
- Doussi, M. & Thanos, C. (1994). Post-fire regeneration of hardseeded plants: Ecophysiology of seed germination. *Proc. 2.^a Int. Conf. Forest Fire Research, Vol.II*, 1035-1044.
- Eastwood, R. (2009). *ENSCONET germination database report*. Consultado em 01 Maio de 2012 através de http://ensconet.maich.gr/PDF/ENSCONETGermination_report.pdf.
- ENSCONET (2009a). [ENSCONET Curation Protocols & Recommendations]. (A. Clemente & M. Martins-Loução, Trans.). London: Royal Botanic Gardens, Kew.

- ENSCONET (2009b). [*Seed collecting manual for wild species*]. (A. Clemente & M. Martins-Loução, Trans.). London: Royal Botanic Gardens, Kew.
- ENSCONET (2009c). ENSCONET - *Germination recommendations*. London: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Franco, J. (1971). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Vol. I, Lycopodiaceae–Umbelliferae, Lisboa.
- Fenner, M. (2000). *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. (2.nd ed). London: CABI-Publishing.
- Ferrand de Almeida, F. (1994). *Poluição ambiental*. Lisboa: Museu do Bocage.
- Ferrandis, P., Herranz, J. & Martínez-Sánchez, J. (1999). Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banques and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology* 144, 103-114.
- Ferreira, M. & Saraiva, I. (2006). Plantas da Flora local com valor alimentar e aromático. In M. Valagão (Org.), *Tradição e inovação alimentar: Dos recursos silvestres aos itinerários turísticos* (pp. 21-43). Lisboa: Edições Colibri/INIAP.
- Ferri, M. (2004). *Botânica - Morfologia externa das plantas*. São Paulo: Nobel.
- Frankel, O., Brown, A. & Burdon, J. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Galmés, J., Medrano, H. & Flexas, J. (2006). Germination capacity and temperature dependence in Mediterranean species of the Balearis Islands. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales*, 15 (1), 88-95.
- García, F. & Villamil, J. (1999). Dormición de semillas. *Hojas Divulgadoras*. Núm. 2103 HD, (pp. 1-20). Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- García, F. & Villamil, J. (2001). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Hojas Divulgadoras*. Núm. 2112 HD (pp.1-16). Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

- GENMEDOC (2006). *Prácticas de germinación en los bancos de semillas de la red GENMEDOC*. Consultado em 14 de Maio de 2012 através de <http://www.semclimed.org/allegati/74.pdf>
- Gilbert, N. (2010). *Habitat loss is the biggest hazard to plant biodiversity*. Consultado em 11 de Outubro de 2010 através de <http://www.nature.com/news/2010/100928/full/news.2010.499.html>.
- Gold, K., León-Lobos, P. & Way, M. (2004). *Manual de recolección de semillas de plantas silvestres: Para conservación a largo plazo e restauración ecológica*. La Serena: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi.
- Gold, K. & Manger, K. (2008). *Selecting containers for long-term seed storage*. Consultado em 12 de Setembro de 2010 através de www.kew.org/msbp/scitech/publications/06-Containers.pdf.
- Gómez-Campo, C. (2002). *Long term seed preservation: the risk of using inadequate containers is very high*. Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid 163, 1-10. Consultado em 12 de Setembro de 2010 através de www.seedcontainers.net.
- Gómez-Campo, C. (2007). *A guide to efficient long term seed preservation*. Monographs ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid 170, 1-17. Consultado em 15 de Setembro de 2010 através de www.seedcontainers.net
- Gómez-Campo, C. (2009). Material genético para el future. Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (AIMJB), *El Botánico* 3, 8-11.
- Gonzalez, C., Heras, J., Nieto, A. & Hernández, E. (2009). *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, Vol XIII. Plantaginaceae - Scrophulariaceae*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- González-Melero, J., Pérez-García, F. & Martínez-Laborde, J. (1997). Effect of temperature, scarification and gibberellic acid on the seed germination of three shrubby species of *Coronilla* L. (Leguminosae). *Seed Science & Technology*, 25, 167-175.

- González-Rabanal, F. & Casal, M. (1995). Effect of high temperatures and ash on germination of ten species from gorse shrubland. *Vegetatio*, 116, 123-131.
- Gosling, P. G. (2003). Viability testing. In R. Smith, J. Dickie, S. Linington, H. Pritchard & R. Probert (Eds.), *Seed conservation: Turning science into practice* (pp. 445-481). Richmond Surrey: Kew Publishing.
- Goulão, L., Hilário, L., Fortunato, M. & Nunes, P. (1998). A importância dos bancos de germoplasma na manutenção da biodiversidade. *AGROS*, LXXXI – N.º 1, 16-20.
- Hayward, H. & Sackville, N. (1997). Genetic diversity – Population structure and conservation. In J. Callow, B. Ford-Lloyd & H. Newbury (Eds.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources - Conservation and Use* (pp. 49-76). London: Cab International.
- Hawkins, B. (2008). *Plants for life: Medicinal plant conservation and botanic gardens*. Richmond Surrey: Botanic Gardens Conservation International.
- Henriques F. (2002). *As florestas, o aquecimento global e a preservação da biodiversidade*. *Floresta e Ambiente*, Outubro-Dezembro, 59, 13-15.
- Hens, L. & Boon, E. (2003). *Causes of Biodiversity Loss: a Human Ecological Analysis*. *MultiCiência: O Futuro dos Recursos* # 1, Out. Consultado em 08 de Novembro de 2011 através de <http://www.multiciencia.unicamp.br>
- Heywood, V. (1994). Jardines Botánicos y la conservación de los recursos fitogenéticos: Un panorama mundial. In J. Bermejo & M. Muñoz (Eds.), *Protección de la Flora en Andalucía* (pp. 125-131). Sevilla: Agencia de Medio Ambiente - Junta de Andalucía.
- Hong, T. & Ellis, R. (1996). *A protocol to determine seed storage behavior*. IPGRI Technical Bulletin, n.º 1.
- ICNB (2006). *Plano sectorial da REDE NATURA 2000*. Consultado em 22 de Maio de 2012 através http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/97845342-028A-4E82-A185-1E2AC9A86414/0/Verbascum_litigiosum.pdf.

- ICNB (2008). *Relatório Nacional de Aplicação da Directiva Habitats (2001 a 2006) - Relatório Executivo* coordenado pelo Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade. Consultado em 05 de Fevereiro de 2012 através de http://www.icnb.pt/reldhabitats/Relat%C3%B3rio%20Executivo/Relat%C3%B3rio_executivo_final_14ago2008.pdf.
- IUCN (2012). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. Consultado em 30 de Setembro de 2012 através de www.iucnredlist.org.
- ISTA (2006). *International Rules for seed Testing*. Bassersdorf: ISTA.
- ISTA (2007). *International Rules for seed Testing*. Bassersdorf: ISTA.
- Jaramillo, S. & Baena, M. (2000). *Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos*. Cali: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.
- Jaramillo, S. & Baena, M. (2002). *Ex situ conservation of plant genetic resource*. Consultado em 05 de Fevereiro de 2012 através de <http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/1252.pdf>
- Kelly, J. (1996). *Growing plants from seed*. London: Ward Lock.
- Maciel, M. (1994). *Dormência das sementes*. Ponta Delgada: Universidade dos Açores.
- MADRP (2000). *Introdução de novas espécies ornamentais no mercado europeu, adaptadas a condições secas e salinas – Projecto AIR3-PL94-2472 (Relatório final)*. Faro: MADRP/DRAP Algarve.
- Mantas, A. (1992). *Dicionário de Agricultura*. Lisboa: Publicações D. Quixote.
- Martínez, I. (2000) *Conservación de recursos fitogenéticos. Segon curs de recerca i conservació de recursos genètics locals. Escola Agrària de Manresa*. Consultado a 09 de Maio de 2012 através de http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_isaura_martin.pdf.
- MAOT (2000). *Relatório do estado do ambiente*. Lisboa: Direcção-Geral do Ambiente.

- MAOT (2001). *Estratégia nacional de conservação da natureza e da biodiversidade*. Lisboa: Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território.
- Maxted, N., Ford-Lloyd, B. & Hawkes, J. (1997). Complementary conservation strategies. In N. Maxted, B. Ford-Lloyd, & J. Hawkes (Eds.). *Plant genetic conservation – The in situ approach* (pp. 15-19). London: Chapman & Hall.
- Maxted, N. & Guarino, L. (2004). Planning plant genetic conservation. In R. Smith, J. Dickie, S. Linington, H. Pritchard & R. Probe (Eds.), *Seed conservation: Turning science into practice* (pp. 38-78). Richmond Surrey: Kew Publishing.
- Moreira, B., Tormo, J., Estrelles E. & Pausas, J. (2010). Disentangling the role of heat and smoke as germination cues in Mediterranean Basin flora. *Annals of Botany* 105, 627–635.
- Muñoz, M. & Garcés, P. (1994). El banco de germoplasma vegetal de Andalucía. In J. Bermejo & M. Muñoz (Eds), *Protección de la Flora en Andalucía* (pp. 125-131). Sevilla: Agencia de Medio Ambiente - Junta de Andalucía.
- Munt, D., Martinez-Laborde, J., Péres-García, F. & González-Benito (2009). The role of the Plant Germoplasm Bank of the Technical University of Madrid in the Global Strategy for Plant Conservation. In D. Aplin, E. Estrelles, A.M. Ibars, D. Lázaro, S. Linington, J. Müller & E. Pastor (Eds.), *ENSCONEWS* 5, 9-10.
- Nieto, A., Feliner, G., Jury, S., & Herrero, A. (Eds.), (2003). *Flora ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: Vol X. Umbelliferae*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Nurse, R. & Cavers, P. (2008). The germination characteristics of *Scrophularia marilandica* L. (Scrophulariaceae) seeds. *Plant Ecology*, 196, 185-196.
- Peña, J., Aparicio-Tejo, P. & Sanches-Díaz, M. (1988). Dormancy mechanism and the effect of scarification in the germination of *Halimium halimifolium* seeds. *Journal of plant physiology*, 132, 54-58.
- Pestana, M. & Gageiro, J. (2000). Análise de dados para ciências sociais: A complementaridade do SPSS (2.^a ed.). Lisboa: Edições Sílabo.

- Pilar, G. & Moysst, L. (1993). Germinación de semillas. In J. Azcon-Bieto & M. Talon (Ed.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: Interamericana Mc Graw-Hill. pp. 581.
- Pimm, S. & Raven, P. (2000). Extinction by numbers. *Nature*, 403:843-845. Consultado em 12 de Abril 2012 através de <http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6772/pdf/403843a0.pdf>
- Pinho, R., Lopes, L., Leão, F. & Morgado, F. (2003). *Conhecer as plantas e seus habitats*. Lisboa: Plátano Edições Técnicas.
- Pité, M. & Avelar, T. (1996). *Ecologia das populações e das comunidades*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Polasky, S., Costello, C. & Solow, A. (2005). The economics of biodiversity. In K-G. Maler & J. Vincent. (Eds.). *Handbook of enviromental Economics, Vol.3*. (pp. 1518-1560). New York: Elsevier.
- Prance, G. (1997). The conservation of botanical diversity. In N. Maxted, B. Ford-Lloyd, & J. Hawkes (Eds.). *Plant genetic conservation – The in situ approach* (pp. 3-11). London: Chapman & Hall.
- Probert, R. & Hay, F. (2000). Keeping Seeds Alive. In M. Black & J. Bewley (Eds.), *Seed technology and its biological basis*. (pp. 375-410). Sheffield: Sheffield Academic Press.
- Quaresma, F. (1993). *Flora dunar da Foz do Rio Mira*. Consultado em 12 de Abril 2012 através de <http://www.milfontes.net/e-book/floradunar.PDF>
- Rahnama-Ghahfarokhi, A. & Tavakkol-Afshari, R. (2007). Methods for dormancy breaking and germination of Galbanum seeds (*Ferula gummosa*). *Asian Journal of Plants Sciences*, 6 (4), 611-616.
- Rao, N., Hanson, J., Dulloo, M., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. (2006). *Manual of seed handling in genebanks. Hadbook for genebanks*. N. 8 Bioversity International: Rome. Consultado em 26 de Agosto de 2010 através de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/ah803e/ah803e00.pdf>.

- Red de Jardines Botánicos (2001). *Espacios para la conservación de la biodiversidad*. Sevilla: Junta de Andalucía.
- Riley, J. (1987). Gibberellic acid for fruit set and seed germination. *California Fruit Rare Growers Journal*, 19, 10-12.
- Relf, D. & Ball, E. (2001). Plant propagation from Seed. *Environmental Horticulture Publication*, 426-001.
- Roberts, H. (1988). Temperature and seed germination. In S., Long & F., Woodward (Eds.), *Plants and Temperature* Vol 42 (pp. 109-132). Cambridge: Company of Biologists
- Rocha, F. (1996). *Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal*. Lisboa: DGPC.
- Romero, F. (1989). *Semillas: Biología y tecnología*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Rosa, H. (2002). O que se passa com a biodiversidade? *Ambiente 21– Sociedade e Desenvolvimento, Fevereiro*, 36-41.
- Sharrock, S. & Jones, M. (2009). *Conserving Europe's threatened plants: Progress towards Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation*. Richmond: BGCI. Consultado em 08 de Novembro de 2011 através de www.bgci.org/plants2020/document/0181.
- Serrano-Bernardo, F., Rosúa, J. & Díaz-Miguel, M. (2007). Efectos de la luz y de la temperatura sobre la germinación de semillas de cuatro especies autóctonas de alta montaña Mediterránea (España). *Revista Internacional de Botanica Experimental*, 76, 27-38.
- Smith, R., Dickie, J. Linington, S., Pritchard, H. & Probert, R. (2003). An editorial perspective on seed conservation. In R. Smith, J. Dickie, S. Linington, H. Pritchard & R. Probert (Eds.), *Seed conservation: Turning science into practice* (pp. 968-980). Richmond Surrey: Kew Publishing.
- Soulé, M. & Sanjayan, M. (1998). Conservation targets: do they help? *Science*, 279, 2060-2061.

- Talavera, S., Aedo, C., Castroviejo, S., Zarco, C., Nieto, A., González, F. Goñzalons, L. & Velayos, M. (1999). *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, Vol VII (I) Leguminosae*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Thanos, C. & Georghiou, K. (1988). Ecophysiology of-stimulated seed germination in *Cistus incanus* ssp. *Creticus* (L) Heywood and *C. salvifolius* L. *Plant – Cell and Environment* 11, 841-849.
- Thanos, C., Georghiou, K. & Skarou, F. (1989). *Glaucium flavum* seed germination: an ecophysiological approach. *Annals of Botany*, 63, 121-130.
- Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C. & Pantazi, C. (1992). Cistaceae: A plant family with hard seeds. *Israel Journal Botany*, 41, 251-263.
- Truiller, W., Albert, C., Araújo M.B. (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 8245-8250.
- Tuckman, B. (2005). Manual de investigação em educação (3.^a ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. [Tradução do original em inglês Conducting educational research (4th ed.) New York: Harcourt Brace College Publishers, 1994]
- Vandelook, F., Bolle, N. & Van Assche, J. (2007). Seed dormancy and germination of the European *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae), a member of a trans-atlântico genus. *Annals of Botany*, 100, 233-239.
- Vasconcelos, T., Caixinhas, L. & Monjardino, J. (2008). *Capacidade germinativa de sementes de endémicas*. Lisboa: ISA
- Viegas, W. & Cecilio, L. (1998). *Biologia vegetal*. Lisboa: Universidade Aberta.
- Villamil, J. & García, F. (1998). Germinacion de semillas. *Hojas Divulgadoras*. Núm. 2090 (1-20). Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Villamil, J. & Laborde, J. (2001). Banco de semillas. *Hojas Divulgadoras*. Núm. 2109 (1-20). Madrid: Ministério de Agricultura Pesca y Alimentación.

- Waldren, S., Martin, J., Curtis, T. & O'Sullivan, A. (2000). Genebanks and biodiversity conservation: The Irish threatened plant genebank project. In B. Rushton (Ed.). *Biodiversity: The Irish dimension* (pp. 135-147). Dublin: Royal Irish Academy.
- Walsh, D., Waldren, S. & Martin, J. (2003). Monitoring seed viability of fifteen species after storage in the Irish threatened plant genebank. *Biology and Environment: Proceedings on the Royal Irish Academy, Vol. 103B, No 2*, 5-67.
- Walter, K. & Gillet, H. (1998). *Redlist of threatened plants*. Cambridge: IUCN.
- Waylen, K. (2006). *Botanic gardens: Using biodiversity to improve human well-being*. Richmond Surrey: BGCI.
- Witt, C. (1985). *Biotechnology and Genetic Diversity*. San Francisco, CA: California Lands Project.
- Wyse Jackson, P. & Akeroyd, J. (1994). *Lignes directrices à suivre pour les plans de conservation et de récupération des végétaux*. Strasbourg: Éditions du Conseil de l'Europe
- Wooland, D. (1997). *Contemporary plant systematics* (2.nd ed.). Michigan: Andrews University Press.

Outras referências bibliográficas consultadas:

Base de dados KEW. Consultado em 19 de Abril de 2012 através de

<http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>.

Base de dados ENSCOBASE. Consultado em 19 de Abril de 2012 através de

http://enscobase.maich.gr/seed_lot_germination.tml?accid=K_58861&taxid=80000056.

The Plant List (2010). Version 1 (accessed 1st January). Consultado em 19 de Abril de 2012 através de <http://www.theplantlist.org>.

INRB – Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P. Consultado em 01 de Agosto de 2012 através de <http://www.lniv.min-agricultura.pt/fotos/editor2/inia/bpgv.pdf>.